

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELL'INSUBRIA

FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

Dipartimento di Medicina Clinica, Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica

Corso di Dottorato di Ricerca in Farmacologia Clinica e Sperimentale - XXV Ciclo



**LA VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA CLINICA ALLA
CLOZAPINA IN PAZIENTI SCHIZOFRENICI: RUOLO DEI
POLIMORFISMI GENETICI DEL CYP450 1A2 E DEGLI
ENZIMI RESPONSABILI DEL TRASPORTO DELLA
CLOZAPINA**

Docente Guida:

Chiar.mo Prof. **Camilla Callegari**

Tesi di Dottorato di:

Dott^{ssa} FRANCESCA CECCON

Matr. n. 266055

Anno Accademico 2011 – 2012

Ringraziamenti

Ringrazio per la collaborazione alla realizzazione di questo progetto di ricerca il Prof. Simone Vender, la Prof.ssa Camilla Callegari, i colleghi Dott.ssa Paola Bortolaso e Dott. Emilio Bolla.

Ringrazio inoltre il Dott. Marco Ferrari e la Sezione di Farmacologia Sperimentale e Clinica del Dipartimento di Medicina Clinica, per il fondamentale contributo nell'analisi genetica e nell'elaborazione statistica dei dati.

INDICE

I. INTRODUZIONE	PAG.1
II. LA CLOZAPINA	PAG. 6
STORIA E SCOPERTA	PAG. 7
CARATTERISTICHE CHIMICHE	PAG. 8
ATTIVITÀ FARMACOLOGICA	PAG. 9
▪ Farmacodinamica	
▪ Farmacocinetica	
APPLICAZIONI CLINICHE.....	PAG. 13
▪ Spettro schizofrenico	
▪ Disturbi di personalità	
▪ Disturbi dell'umore	
▪ Disturbi in età evolutiva	
▪ Disturbi neurologici	
▪ Disturbo da abuso di sostanze	
EFFETTI COLLATERALI E TOLLERABILITÀ	PAG. 20
▪ Effetti ematologici	
▪ Effetti sull'apparato cardiovascolare	
▪ Convulsioni	
▪ Sedazione	
▪ Scialorrea	
▪ Aumento di peso	

- Stipsi
- Nausea e vomito
- Ipertermia
- Mioclono
- Sindrome maligna da neurolettici (*SMN*)
- Effetti sul comportamento
- Effetti sull'apparato endocrino
- Effetti da brusca sospensione
- Effetti extrapiramidali (*EPS*)
- Riduzione della massa ossea
- Enuresi
- Effetti sul rene
- Effetti sul fegato

**DOSAGGIO TERAPEUTICO E CORRELAZIONE CON IL
MONITORAGGIO CLINICO E PLASMATICO DELLA
CLOZAPINA..... PAG. 39**

III. LA VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA PAG. 44

IL SISTEMA DELLE PROTEINE TRASPORTATRICI.....PAG. 45

- Glicoproteina-P
- Breast Cancer Resistance Protein

IL SISTEMA ENZIMATICO DEL CITOCROMO P450..... PAG. 48

FATTORI FISIOLÓGICI: ETÀ E SESSO..... PAG. 51

FATTORI PATOLOGICI..... PAG. 52

FATTORI AMBIENTALI	PAG. 53
---------------------------------	----------------

- Tabagismo
- Assunzione di caffeina

FATTORI GENETICI	PAG. 64
-------------------------------	----------------

IV. FARMACOGENETICA E VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA.....PAG. 66

POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNPs) IN FARMACODINAMICA.....	PAG. 69
---	----------------

- Polimorfismi dei recettori dopaminergici
- Polimorfismi dei recettori serotoninergici

POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNPs) IN FARMACOCINETICA.....	PAG. 76
---	----------------

V. STUDIO SPERIMENTALE..... PAG. 84

OBIETTIVI.....	PAG. 85
-----------------------	----------------

MATERIALI E METODI.....	PAG. 86
--------------------------------	----------------

- Disegno dello studio
- Reclutamento dei pazienti
- Criteri di inclusione ed esclusione
- Valutazione della risposta clinica al trattamento
- Raccolta dei campioni biologici ed estrazione del DNA
- Genotipizzazione – Analisi dei polimorfismi
- Analisi statistica

RISULTATI	PAG. 92
------------------------	----------------

- Descrizione del campione

- Relazione tra caratteristiche della popolazione arruolata e risposta clinica al trattamento
- Correlazione tra genotipo e risposta alla clozapina
- Correlazione tra SNPs e PANSS
- Correlazione tra SNPs e GAF
- Correlazione tra aplotipi e risposta alla clozapina

DISCUSSIONE PAG. 104

VI. CONCLUSIONI PAG. 107

VII. APPENDICE PAG. 111

VIII. BIBLIOGRAFIA PAG. 115

I. INTRODUZIONE

L'uso dei farmaci antipsicotici, di nuova e vecchia generazione, è caratterizzato da una notevole variabilità nell'efficacia terapeutica e nell'insorgenza di effetti collaterali. Questo può rendere la loro gestione in ambito clinico delicata e spesso non favorisce la compliance terapeutica. I meccanismi alla base della variabilità interindividuale nella risposta agli antipsicotici sono in gran parte sconosciuti e possono riconoscere diverse cause che vanno dal sesso, all'età, alla dieta, alle condizioni fisiopatologiche del paziente, fino alle interazioni tra i farmaci in caso di polifarmacoterapia. Tuttavia, uno dei principali e meno prevedibili fattori di rischio nel determinare tale variabilità è rappresentato dalle differenze genetiche dei pazienti (Wilffert et al., 2005).

Negli ultimi anni l'attenzione dei ricercatori si è sempre più focalizzata sugli aspetti farmacogenetici in grado di influenzare la risposta agli antipsicotici sia dal punto di vista farmacodinamico che farmacocinetico. Sul versante farmacodinamico sono in corso ricerche con interessanti prospettive riguardanti i polimorfismi recettoriali.

Gli studi di farmacocinetica, invece, si focalizzano sulla valutazione delle differenze interindividuali nel metabolismo intra ed extraepatico dei farmaci. In particolare i più fecondi filoni di ricerca riguardano:

1. le funzioni di trasporto transmembranico data la notevole importanza che le proteine coinvolte nel trasporto e nell'assorbimento dei farmaci hanno dimostrato di possedere sulla biodisponibilità di alcune sostanze, sulla loro concentrazione plasmatica e sulla frequenza delle reazioni avverse da xenobiotici;
2. il ruolo svolto nel metabolismo epatico di fase I dal sistema enzimatico del CYP450 con i suoi numerosi polimorfismi (T.E.C., 2004; de Leon, 2006; Arranz e de Leon, 2007). Infatti per alcuni isoenzimi del sistema CYP450 è stato possibile individuare polimorfismi genetici che si correlano con una modificazione dell'attività metabolica rispetto alla norma. Soggetti "scarsamente metabolizzanti"

per un determinato isoenzima potrebbero più facilmente andare incontro a reazioni avverse ed effetti collaterali durante la somministrazione di farmaci che per la loro eliminazione dipendono da tale isoenzima, anche a dosaggi considerati normalmente terapeutici; viceversa soggetti “altamente metabolizzanti” potrebbero presentare una risposta insoddisfacente al farmaco con riduzione della sua efficacia.

In ambito psichiatrico gli studi farmacogenetici hanno trovato interessanti applicazioni. Una delle più rilevanti riguarda lo studio dei fattori genetici che influenzano il metabolismo della clozapina.

Tra tutti gli antipsicotici attualmente disponibili, la clozapina riveste un ruolo di primo piano per l'indiscussa utilità terapeutica, che tuttavia si accompagna a una scarsa maneggevolezza in ambito clinico.

La clozapina è stato il primo antipsicotico a essere approvato dalla FDA (*Food and Drug Administration*) con l'indicazione della “terapia della schizofrenia resistente al trattamento” (Citrome et al., 2002). Si tratta infatti di un efficiente antipsicotico atipico con una percentuale di risposta del 60% nei pazienti non responders ai neurolettici classici (Wagstaff, 2003; Eap et al., 2004) e a cui si associa la quasi totale assenza di effetti extrapiramidali. Nonostante questi indubbi vantaggi, durante il trattamento con clozapina, possono insorgere effetti collaterali anche piuttosto gravi che determinano considerevoli problemi nella gestione della terapia (Croissant et al., 2005) e che, in alcune occasioni, possono rendere necessaria la riduzione del dosaggio o addirittura la sospensione del trattamento con conseguenze negative sul piano psicopatologico.

I meccanismi patogenetici implicati nella comparsa di tali eventi avversi e/o della variabilità interindividuale nella risposta alla clozapina non sono ancora completamente noti, ma alcuni potrebbero essere correlati alla concentrazione

plasmatica del farmaco (alcuni effetti collaterali risultano più frequenti per livelli plasmatici di clozapina al di sopra di 1000 ng/ml) e quindi dipendere dal suo metabolismo intra ed extraepatico (assorbimento intestinale, metabolismo del farmaco, trasportatori). Se più soggetti rispondono in modo diverso allo stesso farmaco somministrato alla medesima dose, ciò è in parte legato alle differenze farmacocinetiche secondarie al maggiore o minore funzionamento degli enzimi metabolizzanti epatici oppure a variazioni nell'efficacia del trasporto transmembranico del farmaco.

La clozapina è metabolizzata per il 70% nel fegato dal citocromo CYP450 1A2 (Bertilsson et al., 1994; Özdemir et al., 2001). In letteratura sono presenti numerosi studi in cui viene riportato che esistono consistenti differenze interindividuali nell'attività del CYP1A2 (Fuhr et al., 1994). Per il gene del CYP1A2 sono stati infatti identificati diversi polimorfismi che si correlano con variazioni funzionali dell'attività enzimatica. Alcuni ricercatori hanno indagato la possibile relazione fra tali polimorfismi e la risposta clinica alla clozapina, sia in termini di efficacia del trattamento, che di frequenza di comparsa ed entità degli effetti collaterali (Murray et al., 2006).

Per quanto riguarda le proteine di trasporto, la clozapina è un substrato della glicoproteina P (PGP), codificata dal gene ABCB1 e della breast cancer resistance protein (BCRP), codificata dal gene ABCG2.

Sono oggi noti diversi polimorfismi (SNPs) dei geni ABCB1 e ABCG2 che sono in grado di influenzare l'attività e/o l'espressione dei relativi trasportatori e, di conseguenza, la biodisponibilità dei farmaci e la risposta al trattamento.

Lo studio del ruolo svolto dalle differenze genetiche interindividuali nel determinare variazioni della concentrazione plasmatica di clozapina e, di conseguenza, della risposta clinica al trattamento, può consentire al clinico di:

- migliorare le linee guida per definire un sempre più corretto e sicuro utilizzo di clozapina nella pratica clinica;
- individuare “a priori” i pazienti che, seppur con l’assunzione di un dosaggio elevato, non risponderebbero in maniera soddisfacente;
- evitare di sottoporre i pazienti ritenuti non responders al rischio di sviluppare reazioni avverse al farmaco;
- ridurre il ritardo nell’impostazione della terapia più corretta per il soggetto;
- aumentare la compliance terapeutica.

La tesi si compone di una prima sezione dedicata alla clozapina, con riferimenti riguardanti la storia della scoperta, le caratteristiche chimiche e l’attività farmacologica. Vengono descritte le applicazioni cliniche e le attuali conoscenze relative agli effetti collaterali, alla tollerabilità e al monitoraggio clinico del farmaco.

Nella seconda parte dell’elaborato tratterò più in dettaglio il problema della variabilità interindividuale nella risposta alla clozapina con particolare riferimento al ruolo svolto in quest’ambito dai fattori di ordine genetico e dai polimorfismi del sistema enzimatico del citocromo P450 e dei trasportatori di membrana (glicoproteina P e BCRP).

Dunque esporrò il progetto di ricerca, il cui obiettivo è di approfondire il ruolo svolto dai polimorfismi del citocromo P450, della Glicoproteina P e della BCRP nel determinare la variabilità della risposta clinica (intesa come efficacia terapeutica) alla clozapina.

Al termine saranno riportati i risultati ottenuti, la discussione e le conclusioni.

II. LA CLOZAPINA

STORIA E SCOPERTA

La clozapina è stata sintetizzata per la prima volta nel 1958. Come risulta da una revisione di Hippius (1989), i medici austriaci e tedeschi segnarono per primi, verso la metà degli anni Sessanta, l'efficacia della clozapina come farmaco antipsicotico. Fu immessa sul mercato europeo nel 1972. Sfortunatamente, nel 1974, in Finlandia, otto pazienti trattati con clozapina morirono per il sopravvenire di una condizione di leucopenia con agranulocitosi (Amsler et al., 1977). Pertanto il suo impiego routinario venne sospeso in numerosi Paesi. Tuttavia, poiché molti pazienti schizofrenici a cui era stata sospesa la somministrazione del farmaco andarono incontro a gravi ricadute e non risposero altrettanto positivamente al ripristino dei neurolettici tipici, l'uso della clozapina fu concesso con restrizioni in vari Paesi europei occidentali.

Alla fine degli anni '80, in alcuni centri clinici di ricerca, soprattutto negli Stati Uniti, la clozapina era sempre più utilizzata con alte percentuali di successo in casi di schizofrenia resistenti al trattamento con altri agenti farmacologici. Inoltre, nei casi trattati, il farmaco dimostrava una incidenza di disturbi extrapiramidali nettamente inferiore a quella rilevata nella terapia con gli altri neurolettici in commercio anche per periodi di somministrazione piuttosto lunghi (Casey, 1989; Schmauss et al., 1989).

D'altra parte si era osservato che, monitorando attentamente la crasi ematica, i casi di agranulocitosi (circa 1%) potevano essere identificati precocemente evitando gli esiti mortali con la tempestiva sospensione del farmaco (Alvir et al., 1993).

Pertanto, sulla base di una rilevante e sempre crescente documentazione clinica, la Food and Drug Administration (FDA) autorizzava la immissione in commercio della clozapina nel 1993 con l'indicazione limitativa della "terapia della schizofrenia

resistente al trattamento” e subordinando il suo uso al monitoraggio continuo della crasi ematica.

In rapida successione quasi tutte le nazioni europee ed extraeuropee autorizzavano la commercializzazione di clozapina con le medesime indicazioni e limitazioni.

In Italia la clozapina (*Leponex*) è stata autorizzata al commercio nel 1995. La formulazione farmaceutica disponibile è la compressa da 25 mg o da 100 mg.

CARATTERISTICHE CHIMICHE

Come riportato dettagliatamente da Baldessarini e Frankenburg nel 1991 la clozapina è una dibenzodiazepina (8-cloro-11-(4-metil-piperazinil)-5H-dibenzo[1,4]diazepina) (**Figura 1**). È chimicamente correlata agli antagonisti del recettore della dopamina loxapina e clotiapina e agli antagonisti della serotonina-dopamina olanzapina e quetiapina.

Dal momento che rappresenta il primo agente al quale è stato possibile attribuire, accanto a una incisiva proprietà antipsicotica, effetti collaterali extrapiramidali assai modesti o nulli (Fitton e Heel, 1990) e l'assenza di induzione di discinesia tardiva o di un'elevazione dei livelli di prolattina (Meltzer, 1995), la clozapina viene considerata il prototipo degli antipsicotici atipici (Stahl, 2002).

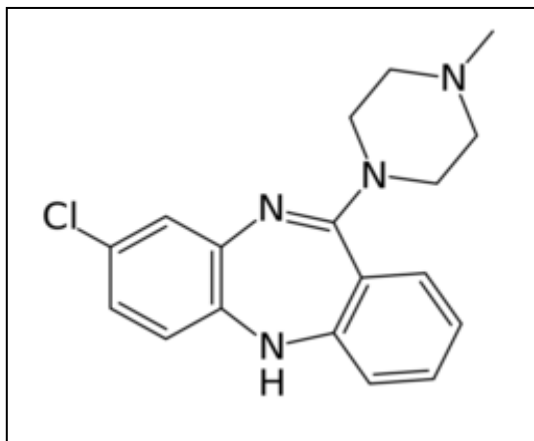


Figura 1. *Struttura molecolare della clozapina*

ATTIVITÀ FARMACOLOGICA

Farmacodinamica

Gli antipsicotici atipici non sono semplicemente degli antagonisti serotoninodopaminergici (SDA). In realtà essi possiedono alcuni degli insiemi più complessi di proprietà farmacologiche della psicofarmacologia (Stahl, 2002).

La clozapina viene classificata come antagonista recettoriale multiplo per la sua affinità a una ampia gamma di recettori. Il suo antagonismo si manifesta infatti a livello dei recettori della serotonina 5HT_{2A}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₆, 5HT₇, della dopamina D₁, D₂, D₄, D₅ e della noradrenalina α_1 e α_2 . Possiede inoltre una buona capacità di legame con i recettori istaminici H₁ e H₂ e colinergici M₁ e M₄ (Vampini e Bellantuono, 2002).

La sua potenza di blocco recettoriale alle dosi terapeutiche è relativamente più elevata per i recettori 5HT₂ (occupati quasi al 100%) che per i recettori D₂ (occupati al 50%), come ricavato dagli studi in vivo con la tomografia a emissione di positroni (PET).

Nei modelli animali la clozapina appare più attiva sul sistema dopaminergico mesolimbico che su quello nigrostriatale, un'osservazione che si correla con l'assenza di effetti parkinsoniani. La scarsità di EPS è da imputare inoltre alla bassa affinità del

farmaco, rispetto agli antipsicotici tipici, per i recettori dopaminergici D_2 , contrariamente a quanto avviene per quelli D_1 , per i quali la capacità di legame è riportata intorno a 33-59% (**Tabella 1**).

Rispetto agli altri farmaci della stessa classe si rilevano le seguenti differenze (Pancheri, 2003):

- assieme alla quetiapina è il farmaco con la minima affinità per i recettori D_2 ;
- tra i farmaci bloccanti $5HT > DA$ ha la minima affinità per i recettori $5HT_{1A}$;
- l'affinità per i recettori α_2 si situa subito dopo quella del risperidone;
- l'affinità per i recettori H_1 è inferiore a quella del risperidone e simile a quella della quetiapina;
- l'affinità per i recettori muscarinici è la più elevata di tutto il gruppo.

Sulla base di questi dati di affinità recettoriale la clozapina fa prevedere, a livello clinico prescindendo dalla sua azione antipsicotica, una buona capacità di sedazione con tendenza tuttavia all'aumento di peso (recettori H_1), una bassa incidenza di disturbi EP (ridotta saturazione dei recettori D_2 ed elevato blocco M_1) e una moderata potenzialità di effetti antidepressivi (recettori $5HT_{1A}$).

D₁ dopaminergici	Correlati clinici poco conosciuti. Potrebbe facilitare la trasmissione DA corticofrontale (attività sui sintomi negativi?)
D₂ dopaminergici	Azione sui sintomi positivi. Induzione di disturbi EP e della sindrome negativa da neurolettici (SNN). Rallentamento motorio.
D₄ dopaminergici	Nessuna azione sui sintomi positivi. Possibile, ma non dimostrata azione sul tono dell'umore.
5HT_{2A} serotoninergici	In associazione con il blocco D ₂ (se di entità inferiore a quella del blocco 5HT _{2A}), possibile azione sui sintomi negativi. Azione antiaggressiva. Probabile compensazione dei disturbi EP indotti dal blocco D ₂ .
H₁ istaminici	Sedazione, sonnolenza, azione antiaggressiva. Aumento di peso, ipotensione posturale.
M₁ colinergici muscarinici	Compensazione dei disturbi EP indotti dal blocco D ₂ . Disturbi anticolinergici: xerostomia, ritenzione urinaria, stipsi, tachicardia.
α₁ adrenergici	Sedazione, ipotensione posturale, tachicardia.
α₂ adrenergici	Possibile azione antidepressiva (il blocco degli autorecettori presinaptici normalizzerebbe la trasmissione serotoninergica). Possibile potenziamento dell'attività DA in sede corticofrontale.

Tabella 1. *Correlati clinici del blocco recettoriale della clozapina (estratto da Pancheri, 2003).*

Farmacocinetica

La clozapina viene rapidamente assorbita a livello del tratto gastrointestinale, indipendentemente dall'assunzione di cibo. Il picco plasmatico dopo singola somministrazione orale è raggiunto, in media, dopo 2,5 ore.

La biodisponibilità è molto variabile, in considerazione dell'elevato effetto di "primo passaggio" a livello epatico: viene stimata comunque attorno al 50% circa della dose somministrata.

La clozapina è legata alle proteine plasmatiche nella misura del 97% circa. L'emivita plasmatica dopo somministrazione di 75 mg è di 8 ore. Lo steady-state viene di solito raggiunto in 3-4 giorni se ci si avvale di una duplice somministrazione giornaliera.

Il farmaco è estesamente metabolizzato a livello epatico e meno dell'1% viene eliminato per via renale senza subire alcuna trasformazione (Cheng et al., 1988). Il metabolismo si realizza principalmente in seguito a processi di ossidazione catalizzati dall'enzima citocromo P450 1A2 (CYP1A2), con produzione di metaboliti N-desmetil e N-ossido a ridotta attività farmacologica (Baldessarini e Frankenburg, 1991; Eiermann et al., 1997; Prior et al., 1999; Özdemir et al., 2001; Raggi et al., 2004; Murray, 2006). L'eliminazione di tali metaboliti si realizza poi attraverso l'emuntorio renale (50%) e per via intestinale (30%) (Jann et al., 1993; Byerly e De Vane, 1996).

Numerosi studi riportano come altre isoforme del CYP450 siano coinvolte in minor misura nei processi di biotrasformazione della clozapina, e in particolare: il CYP2D6, il CYP3A4, il CYP2C19 e il CYP2C9 (Bertilsson et al., 1994; Eierman et al., 1997; Aitchison et al., 2000; Olesen et al., 2001).

APPLICAZIONI CLINICHE

Spettro schizofrenico

L'indicazione specifica all'impiego clinico di clozapina, condivisa sia negli Stati Uniti che in Italia, è la schizofrenia resistente al trattamento. La resistenza al trattamento può essere definita come il divario fra i risultati terapeutici attesi (sulla base delle conoscenze fornite dalla letteratura, dell'esperienza del medico e delle condizioni del paziente) e l'efficacia della terapia. Tuttavia, nella corretta definizione dei casi di resistenza, restano aperte alcune importanti questioni. *Il primo problema* consiste nell'individuare i casi di falsa resistenza, correlata a errori diagnostici, di scelta farmacologica e di dosaggio. *Il secondo problema* è la definizione di criteri che consentano di identificare la resistenza in modo non ambiguo. *Il terzo problema* riguarda la decisione di cambiare approccio farmacologico nei casi riconosciuti come resistenti al trattamento (Pancheri, 2007).

Nel 1990 Kane pubblica i primi criteri operativi per la resistenza al trattamento nella schizofrenia. Secondo l'autore, sono necessari almeno tre periodi distinti della durata minima di sei settimane ciascuno di trattamento farmacologico con almeno due diverse classi di antipsicotici a dosaggio corrispondente a 1000 mg di clorpromazina e l'assenza di variazioni significative della condizione psicopatologica nei cinque mesi precedenti. Tali criteri sono da subito risultati molto restrittivi e difficilmente applicabili nella pratica clinica in quanto imponevano una distinzione dicotomica tra presenza/assenza di determinati parametri e non consideravano i sintomi iatrogeni indotti da così elevati dosaggi di antipsicotici. Per questo Brenner e colleghi nel 1990 hanno formulato una scala di valutazione della risposta e della resistenza al trattamento della schizofrenia che prevede sette livelli graduati di farmacoresistenza: *remissione clinica*, *remissione parziale*, *lieve resistenza*, *moderata resistenza*, *grave resistenza*, *refrattario*, *gravemente*

refrattario. I diversi livelli vengono individuati sulla base dell'osservazione clinica (rapidità di riduzione dei sintomi schizofrenici, persistenza dei sintomi negativi o positivi) e tramite l'ausilio di scale per la valutazione del danno psicosociale, ossia la *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) di Overall e Gorham (1962), la *Independent Living Skills Survey* e la *Clinical Global Impression severity* (CGIs).

In aggiunta alla farmacoresistenza, l'efficacia di clozapina è stata dimostrata nei casi di polidipsia psicogena e iatrogena (Goldman, 2010) e nel trattamento degli episodi d'esordio. Inoltre clozapina possiede una notevole efficacia nel ridurre l'aggressività nei pazienti schizofrenici (Topiwala e Seena, 2011).

A fronte dell'indiscusso miglioramento dei sintomi positivi e del quadro clinico complessivo dopo somministrazione di clozapina, l'efficacia del farmaco nel ridurre i sintomi negativi primari (abulia, impoverimento, apatia, ritiro sociale e mancanza di progettualità) è ancora oggetto di dibattito. Il miglioramento riscontrato a questo livello, infatti, viene attribuito almeno in parte alla riduzione dei sintomi negativi indotti dai precedenti trattamenti farmacologici. Alcuni autori, però, focalizzano l'attenzione sulla capacità della clozapina di ridurre sintomi negativi anche in episodi d'esordio di schizofrenia mai trattati in precedenza. Si è riscontrato inoltre che il miglioramento globale e sui sintomi negativi tende a permanere durante la terapia a lungo termine: ciò suggerisce che clozapina sia effettivamente in grado di agire anche sui sintomi negativi primari (Buchanan et al., 1998; Munitz, 2012).

Durante il trattamento con clozapina è stata registrata una riduzione del numero dei ricoveri e dell'incidenza delle riacutizzazioni della patologia (Meltzer et al., 2010).

L'implementazione delle competenze cognitive favorita da clozapina consente il recupero del funzionamento psicosociale, con possibilità di reinserimento scolastico e lavorativo (Kaneda et al., 2010).

È stata infine sottolineata l'efficacia della clozapina sul sintomo di disorganizzazione (Wahlbeck et al., 1999) e nel trattamento a lungo termine della schizofrenia soprattutto in confronto con farmaci di controllo come aloperidolo e cloropromazina (Rosenheck et al., 1998; Howanitz et al., 1999). Infine riduce la frequenza di comportamenti suicidari, presumibilmente per il miglioramento dei sintomi affettivi (Meltzer et al., 1989; Kasckow et al., 2011).

Disturbi di personalità

I dati raccolti sino a ora si riferiscono pressochè esclusivamente al trattamento del disturbo borderline di personalità. Uno studio condotto nel 1993 da Frankenburg su 15 pazienti ha dimostrato l'efficacia di clozapina nel ridurre i sintomi della dimensione psicotica e nell'incrementare il livello di funzionamento globale. Così nel 1998 Benedetti e colleghi hanno riportato evidenti miglioramenti sia sul piano affettivo che della dimensione psicotica in 12 pazienti trattati con clozapina a dosaggi relativamente bassi (25-100 mg/die). Sul piano comportamentale l'uso di clozapina ha consentito la riduzione dell'impulsività e dei comportamenti auto ed eteroaggressivi (Swinton, 2001). Più recentemente è stato riportato in letteratura il caso clinico di un paziente che ha mostrato un evidente miglioramento con un dosaggio giornaliero di 175 mg (Vohra, 2010).

Disturbi dell'umore

Numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia della clozapina nella mania, nel disturbo bipolare a cicli rapidi e nella terapia del disturbo schizoaffettivo (Barbini et al., 1997; Frye et al., 1998; Ciapparelli et al., 2000; Green et al., 2000).

Nel trattamento della mania, la clozapina ha riportato una percentuale di miglioramento pari al 70% dei casi trattati. Gran parte della documentazione clinica oggi disponibile fa riferimento a una casistica di mania con sintomi psicotici (deliri, allucinazioni, disorganizzazione). In questi casi l'efficacia della clozapina è risultata evidente sia nelle osservazioni a breve che a lungo termine. I dosaggi utilizzati sono analoghi a quelli della terapia della schizofrenia. Nel caso della mania acuta le dosi iniziali tendono a essere superiori (400-500 mg/die), con una successiva riduzione progressiva, parallelamente al miglioramento sintomatologico. Resta aperto il problema dell'utilizzazione della clozapina come terapia di mantenimento sia pure a dosi ridotte.

Il disturbo bipolare a cicli rapidi può risultare particolarmente resistente al trattamento con gli stabilizzatori. In particolare la risposta alla litoterapia appare molto scarsa. La risposta agli anticonvulsivanti è migliore, ma la percentuale di insuccessi terapeutici permane comunque piuttosto elevata. Per questa ragione nel trattamento di tale disturbo vengono spesso associati antipsicotici tipici, con l'aumento tuttavia del rischio di disturbi extrapiramidali e in particolare la discinesia tardiva. A partire dal 1991 sono stati riferiti in letteratura numerosi casi di netta efficacia della clozapina, in termini di riduzione di frequenza e di gravità degli episodi, nel disturbo a cicli rapidi resistente a ogni altra forma di trattamento. I risultati positivi si riferiscono sia alla monoterapia che alla terapia in add-on.

Infine, l'evidenza clinica dell'efficacia della clozapina nel disturbo schizoaffective sembra positiva (la percentuale di casi resistenti ad altri trattamenti in cui è stato riscontrato un miglioramento significativo oscilla tra il 60 e il 70% del totale), ma necessita di ulteriori conferme (Pancheri, 2003).

Disturbi in età evolutiva

L'impiego di clozapina in età evolutiva è ben documentato in letteratura. I dati raccolti considerano sia monoterapie con clozapina, sia terapie in add-on.

Nel 1996 uno studio condotto in doppio cieco per 6 settimane su 21 pazienti di età media di 14 anni, ha confrontato l'efficacia terapeutica di clozapina (a un dosaggio medio di 176 mg/die) vs aloperidolo (dose media giornaliera 16 mg). Dallo studio è emerso che clozapina presenta efficacia superiore ad aloperidolo in termini di miglioramento di sintomi positivi e negativi; per un terzo dei pazienti, però, si è resa necessaria la sospensione del trattamento con clozapina per comparsa di neutropenia o convulsioni. L'abbassamento della soglia convulsivante è stata normalizzata tramite somministrazione di Valproato di sodio (Kumra et al., 1996).

Nel 2006 Shaw e colleghi hanno valutato in doppio cieco per 8 settimane 25 pazienti di età media di 12 anni in terapia con clozapina (dose media 327 mg/die) vs olanzapina (dose media 18.1 mg/die). Anche in questo caso clozapina ha dimostrato efficacia superiore sulla riduzione dei sintomi positivi, a fronte tuttavia di un incremento ponderale maggiore rispetto a olanzapina. Kumra e colleghi hanno condotto un nuovo studio nel 2007 della durata di 12 settimane. In questo caso lo studio in doppio cieco ha messo a confronto clozapina (a dosaggio medio di 401 mg/die) vs olanzapina (dose media giornaliera 26.2 mg) in un campione di 39 pazienti di età media di 15.6 anni. La clozapina ha mostrato una capacità di indurre la riduzione di sintomi sia positivi che negativi pari al 66%, rispetto al 33% di olanzapina. Il 39% dei pazienti ha però incrementato il proprio peso di oltre il 7% rispetto al basale.

Negli ultimi anni, clozapina è stata indicata per il trattamento della schizofrenia a esordio precoce in bambini e adolescenti, in quanto ha mostrato efficacia pari, se non superiore, rispetto agli adulti (Mattai et al., 2010).

Da quanto esposto, appare evidente che l'impostazione di una terapia con clozapina in età evolutiva non può prescindere da un'attenta valutazione del rischio di effetti avversi, in particolare neutropenia, convulsioni e incremento ponderale. Qualora si ricorra alla somministrazione di clozapina, il rischio di effetti avversi può, comunque, essere minimizzato attraverso un attento monitoraggio delle condizioni cliniche del paziente, sia dal punto di vista somatico che psicopatologico.

Disturbi neurologici

Nel trattamento della discinesia tardiva sono stati ottenuti buoni risultati con la somministrazione di clozapina (Pancheri 2003). Il miglioramento è dose dipendente e nella maggior parte dei pazienti si verifica entro le prime 4 settimane di terapia (Bhydaisiri e Boonyawairoj, 2010). Per quanto riguarda il dosaggio, nel 20-30% dei casi la remissione completa della sintomatologia si è verificata alle stesse dosi utilizzate per la terapia della schizofrenia. È stato recentemente descritto un caso clinico in cui, con un dosaggio di clozapina di 200 mg/die, si è ottenuto un miglioramento della discinesia in sole 2 settimane (Paharai, 2011). Il meccanismo responsabile di questa attività è stato individuato nella affinità di clozapina per i recettori D_1 e D_2 , nel potente antoagonismo serotoninergico e nella sua azione anticolinergica con conseguente potenziamento dell'attività dopaminergica del fascio nigrostriatale.

Grande utilità dell'impiego di clozapina è stata rilevata nella gestione di sintomi psicotici occorsi durante il trattamento del morbo di Parkinson con dopamino-agonisti, in particolare con Levodopa (Pollak et al., 2004; Zahodne e Fernandez, 2010; Wood et al., 2010). In questi casi i neurolettici tradizionali, con la loro azione bloccante prevalente o selettiva per i recettori D_2 , possono causare un peggioramento del quadro neurologico e acuire i sintomi "negativi" che spesso si accompagnano alla malattia. La

clozapina consente di ottenere una riduzione o la risoluzione dei sintomi psicotici senza aggravare il quadro neurologico.

Infine, è stata indagata l'utilità di clozapina nel trattamento dei tics sia primitivi che secondari. Per quanto riguarda i tics primitivi (Sindrome di Tourette) non è risultata di alcuna utilità terapeutica, ma, anzi, ha mostrato la capacità di esacerbare tics faciali e balbuzie (Caine et al, 1979; Begum, 2005; Bastiampillai et al., 2008; Roessner et al., 2011). Per il trattamento dei tics secondari a lesioni o infezioni del SNC, invece, da una recente review clozapina si impone come farmaco di effettiva utilità (Shprecher e Kurlan, 2009).

Disturbo da abuso di sostanze

In letteratura è documentata l'efficacia di clozapina in pazienti schizofrenici con problemi di abuso di sostanze (Lubman et al., 2010).

In una review recente la clozapina è risultata efficace nel ridurre la dipendenza da alcool e cannabis grazie alla debole azione di blocco dopaminergico e al potenziamento dell'attività noradrenergica e serotoninergica. Queste proprietà farmacodinamiche migliorano la disfunzione del circuito mesolimbico dopaminergico, la quale risulta implicata nello sviluppo, nel rinforzo e nel mantenimento della dipendenza da sostanze alcoliche (Zhornitsky et al., 2010).

EFFETTI COLLATERALI E TOLLERABILITÀ

Nonostante l'ormai dimostrata efficacia clinica, il ricorso alla somministrazione di clozapina è spesso poco maneggevole a causa di diversi effetti collaterali, talvolta di entità tale da comportare problemi di gestione della terapia sino a giungere, in alcuni casi, alla necessità di interruzione del trattamento.

Fra quelli molto frequenti ($>1/10$) vanno segnalati: eccessiva sedazione, capogiri, tachicardia, stipsi e ipersalivazione. Fra quelli frequenti ($>1/100$) compaiono invece: aumento di peso, alterazioni elettrocardiografiche, ipertensione e ipotensione, nausea, vomito e anoressia, alterazione degli enzimi epatici, ipertermia benigna, incontinenza urinaria e varie alterazioni neurologiche fra cui sintomi extrapiramidali, cefalea e abbassamento della soglia convulsiva (Wagstaff et al., 2003).

I più frequenti effetti collaterali della clozapina sono diretta conseguenza del suo profilo farmacologico; altri, come l'agranulocitosi, sono invece di tipo idiosincrasico e come tali difficilmente prevedibili. Sul piano della tollerabilità la clozapina si distingue per i rari e modesti effetti collaterali extrapiramidali ed è, a oggi, l'unico antipsicotico in cui il rischio di discinesia tardiva è scarso o assente (Kane, 1996).

Fin dai primi studi clinici sulla clozapina è stato possibile rilevare che il tempo di comparsa degli effetti di questo farmaco presenta un tipico andamento fasico. Angst (1971), a proposito del profilo di attività, descriveva dapprima la comparsa di una rapida e intensa azione ipnogenica e sedativa (nell'arco di minuti o ore), cui subentrava quella sull'aggressività (nello spazio di giorni), seguita dall'effetto sulla sintomatologia produttiva (settimane) e, infine, da quello sulla sintomatologia difettuale (mesi).

Anche il profilo di tollerabilità presenta un andamento a fasi differenziate, per cui la maggioranza degli effetti collaterali del farmaco si verifica nelle prime settimane o nei

primi mesi di trattamento e il solo incremento ponderale e la stipsi risultano essere effetti anche tardivi (oltre l'anno di trattamento) (Hummer et al., 1995).

Di seguito verranno presentati e descritti i principali effetti collaterali che sono stati registrati in corso di trattamento con clozapina (**Tabella 2**).

Particolare attenzione verrà dedicata agli effetti ematologici, in quanto il rischio di una leucopenia/agranulocitosi (C.I.A., *Clozapine-Induced Agranulocytosis*) rappresenta il principale problema di sicurezza in corso di trattamento con clozapina.

Effetto collaterale	%
Sonnolenza/sedazione	34
Aumento ponderale	34
Scialorrea	23
Sintomi gastroenterici	17
Ipotensione	11
Tachicardia	7
Ipertermia	5
Convulsioni (a dosi > 600 mg/die)	4
Agranulocitosi	1

Tabella 2. *Effetti collaterali più frequentemente osservati in corso di trattamento con clozapina in 15.000 pazienti (Baldessarini e Frankenburg, 1991).*

Effetti ematologici

L'agranulocitosi costituisce il più importante effetto collaterale della clozapina, quello che ne ha condizionato l'evoluzione storica e le modalità di impiego. Si definisce

“neutropenia” un valore assoluto di neutrofili compreso tra 1500 e 500/mmc e “agranulocitosi” una riduzione dello stesso sotto 500/mmc.

Leucopenia e agranulocitosi si verificano nell'1% dei casi trattati. In età infantile questa percentuale sembra essere superiore (2-3%). Tali fenomeni si manifestano con maggiore probabilità nei primi tre mesi di trattamento (oltre l'85% dei casi si verifica nel corso delle prime 18 settimane). Successivamente il rischio si riduce in modo netto e progressivo fino a rendere l'evento improbabile (anche se possibile) in corso di lunghi trattamenti. Infatti, se nel corso del primo anno la sua incidenza è circa del 2%, al terzo anno si riduce allo 0,12%, con un rischio sovrapponibile a quello delle fenotiazine (Kerwin, 1993).

La neutropenia da clozapina non è dose-dipendente e colpisce entrambi i sessi, anche se l'incidenza nella popolazione femminile è circa il doppio di quella maschile (Lambertenghi Delilieri, 1993).

Il meccanismo patogenetico rimane incerto. Sono state avanzate diverse ipotesi sia tossiche che immunologiche e non si può escludere un contemporaneo coinvolgimento di entrambi i meccanismi. È stata suggerita la possibilità di un'azione tossica diretta di uno dei metaboliti della clozapina (N-dismetilclozapina) piuttosto che della clozapina stessa (Gerson e Meltzer, 1992).

Alcuni studi riportano una possibile relazione con gli antigeni di istocompatibilità e, in particolare, un'associazione tra l'aplotipo HLA-B38, -DR4 e -DQ3 e l'agranulocitosi da clozapina (Yunis et al., 1995; Valevski et al., 1998).

Poiché il fenomeno non si manifesta clinicamente, se non nelle fasi avanzate di neutropenia (agranulocitosi), quando possono sopravvenire manifestazioni infettive con il relativo corredo sintomatologico, la procedura di monitoraggio ematico è una condizione vincolante per la somministrazione del farmaco (**Tabella 3**).

Le norme attuali richiedono che i controlli dei leucociti vengano effettuati ogni settimana nei primi 3 mesi di trattamento e una volta al mese successivamente. È inoltre necessario un esame ematologico completo prima di iniziare la terapia.

Generalmente la neutropenia si risolve rapidamente (alcuni giorni), dopo la sospensione del farmaco (neutropenia transitoria). Solo in una minoranza di casi può evolvere in agranulocitosi (Honigfeld, 1996). La risoluzione dell'agranulocitosi, non trattata con fattori di crescita, avviene solitamente entro 14-24 giorni, in relazione alla gravità dell'evento e alla presenza o meno di una complicazione settica (Gerson e Meltzer, 1992). Il ricorso ai fattori di crescita, che è consigliabile quando i neutrofili scendono sotto 1000/mm³, consente di dimezzare i tempi di recupero e costituisce un'ulteriore garanzia di prognosi favorevole (Geibich e Marks, 1993; Nielsen, 1993; Oren et al., 1993; Ryabik et al., 1993; Krupp e Dev, 1994).

	Leucociti	Granulociti	
Basale	> 3500	> 2000	Iniziare il trattamento.
	< 3000	≤ 1500	Non iniziare il trattamento.
Primi 6 mesi	≥ 3500	≥ 1500	Controlli settimanali. Proseguire la terapia.
	< 3500	< 1500	Sospendere la terapia. Monitorare per 4 settimane i leucociti.
	< 2000	< 1000	Sospendere la terapia. Monitorare i leucociti ogni 2 giorni.
	≤ 1000	≤ 500	Ricovero in ematologia.
Dopo 6 mesi	≥ 3500	≥ 1500	Controlli mensili. Continuare il trattamento.
	< 3500	< 1500	Sospendere la terapia. Monitoraggio per 4 settimane.

Tabella 3. Monitoraggio ematico in corso di trattamento con clozapina (Pancheri, 2003).

In merito alla comparsa di altre alterazioni ematiche in corso di terapia con clozapina, sono stati riportati casi di leucocitosi (definita come la presenza di una conta leucocitaria $>11.500/\text{mm}^3$), prevalentemente rappresentati da eosinofilia (Patel et al., 2012) e neutrofilia (Sopko e Caley, 2010; Liu et al., 2011). Generalmente il manifestarsi di una leucocitosi non è accompagnato da alcuna rilevanza clinica e non può essere considerata predittiva nei confronti di una successiva neutropenia (Hummer et al., 1996). La leucocitosi insorge durante le prime settimane di trattamento, ma a fronte della

tendenza a una spontanea risoluzione, non richiede né una terapia specifica né la sospensione del trattamento antipsicotico: è sufficiente limitarsi a un attento monitoraggio. Di fondamentale importanza, prima di confermare la correlazione con l'assunzione di clozapina, è l'esecuzione di un'approfondita indagine ematologica al fine di poter escludere qualunque altra possibile causa di leucocitosi (Pradipta, 2011).

Anche l'eosinofilia può rappresentare un fenomeno emergente durante la prima fase del trattamento con clozapina (generalmente entro la quinta settimana), associata anch'essa a rapida reversibilità e assenza di manifestazioni o sequele sia in ambito internistico che psichiatrico. Anche in questo caso la diagnosi di eosinofilia indotta da clozapina può essere posta solamente dopo esclusione di ogni altra possibile causa.

Infine, durante il trattamento con clozapina, sono stati riportati casi di trombocitopenia. Nonostante questa possibile evenienza, il monitoraggio della conta piastrinica è ritenuto necessario soltanto nel momento in cui la trombocitopenia si renda clinicamente manifesta. La sospensione di clozapina si impone a fronte di una conta piastrinica $<100.000/\text{mm}^3$.

Effetti sull'apparato cardiovascolare

Gli effetti avversi a carico del sistema cardiovascolare insorgono durante le fasi iniziali del trattamento, sono generalmente di modesta entità e rapidamente reversibili. Il 25% circa dei pazienti in terapia con clozapina manifesta tachicardia (Lieberman et al., 1998). Tale evento, più che al possibile effetto ipotensivo del farmaco, sembra essere correlato all'attività anticolinergica di clozapina e all'aumento della disponibilità plasmatica di noradrenalina (Lieberman e Safferman, 1992). La tachicardia si presenta in forma generalmente transitoria e può essere correlata alla rapidità di incremento della

dose. Tuttavia, nel caso persista a lungo, un trattamento con farmaci β -bloccanti potrebbe rendersi necessario.

L'ipotensione indotta da clozapina è correlata all'attività di antagonismo sui recettori α -adrenergici; è generalmente transitoria e insorge nelle fasi iniziali del trattamento (Lieberman e Safferman, 1992). L'incidenza e la gravità dell'ipotensione sono influenzate dalla concentrazione plasmatica di clozapina e dalla rapidità dell'incremento della dose somministrata. Solitamente i pazienti sviluppano tolleranza, anche se in una minoranza di casi la condizione ipotensiva può persistere e divenire un ostacolo per una corretta ed efficace terapia con clozapina (Miller, 2000).

Seppur in un limitato numero di casi, nelle fasi precoci di trattamento sono stati riportati episodi di ipertensione, generalmente scatenati da una titolazione del farmaco eccessivamente rapida (Ereshefsky et al., 1989). Raramente sono state segnalate alterazioni a carico dell'ECG e disturbi della ripolarizzazione (appiattimento dell'onda T, torsione di punta e allungamento dell'intervallo QT) (Wenzel-Seifert et al., 2011).

In corso di terapia con clozapina sono stati riportati casi, seppur rari, di arresto cardiaco e/o respiratorio (Lieberman et al., 1992). Tale evenienza è stata riscontrata sia in monoterapia, sia in associazione di clozapina con benzodiazepine o altri antipsicotici (Friedman et al., 1991). È dunque necessario considerare la possibilità che tale antipsicotico svolga una significativa azione depressiva sul sistema nervoso centrale ed è pertanto necessario prestare particolare attenzione nell'impostare tale terapia in associazione con benzodiazepine o altri antipsicotici (Miller, 2000).

In letteratura sono riportati diversi casi clinici che testimoniano la correlazione tra la somministrazione di clozapina e l'insorgenza di cardiomiopatia dilatativa e miocardite. In quest'ultimo caso, è raccomandato il monitoraggio dei livelli di proteina C reattiva

(PCR) durante le prime 4 settimane, con indicazione alla sospensione del trattamento soltanto per livelli di PCR superiori a 100 mg/L (Ronaldson et al., 2011).

Recenti studi (Tripp, 2011; Jönsson et al., 2012; Allenet et al., 2012) riportano casi di tromboembolismo; seppure clozapina non sia controindicata in pazienti con precedenti eventi tromboembolici o portatori di fattori di rischio, in tal senso la possibilità dell'insorgenza di tale evento richiede cautela nell'intraprendere la terapia.

Convulsioni

È dimostrata una correlazione tra l'assunzione di clozapina e un aumento dell'incidenza di convulsioni: fino al 4,5% dei pazienti trattati con l'antipsicotico, infatti, incorrono in episodi di tipo convulsivo (Toth et al., 1994; Steinert et al., 2011). L'abbassamento della soglia convulsivante è dose dipendente e sembra essere correlata alla rapidità di incremento della dose. I pazienti che assumono meno di 300 mg/die di clozapina corrono un rischio di manifestare l'evento avverso dell'1-2%, pari a coloro che assumono altri antipsicotici; a un dosaggio compreso tra 300 e 600 mg/die il rischio sale al 3% per raggiungere il 4% per dosaggi superiori a 600 mg/die. Fattori in grado di favorire la comparsa di convulsioni, oltre alla rapidità di incremento della dose, sono la concomitante assunzione di farmaci potenzialmente epilettogeni e una anamnesi personale positiva per anomalie in ambito neurologico. Il significato predittivo delle alterazioni dell'EEG appare controverso (Nishant et al., 2011).

Sedazione

La sedazione è l'effetto più comunemente riscontrato durante la terapia con clozapina. Solitamente insorge all'inizio del trattamento con un picco entro la sesta settimana, per poi ridursi con il proseguire della cura per lo sviluppo di tolleranza (Lieberman et al.,

1989; VanderZwaag et al., 1996; Wulff et al., 2012). L'effetto sedativo di clozapina viene ricondotto alla sua azione antistaminica e antiadrenergica. Dalle valutazioni elettrofisiologiche emerge un aumento della durata della fase REM a discapito del sonno a onde lente, per una dissociazione del rapporto non REM/REM (Elomaa, 1994). Infine, da un recente studio (Cohrs, 2008) emerge la possibile correlazione tra la somministrazione di clozapina e la comparsa di disturbi specifici del sonno come sonnambulismo, restless legs syndrome e alterazioni respiratorie legate al sonno.

Scialorrea

Nonostante l'esatta frequenza sia difficile da determinare (sono, infatti, riportate percentuali da 0 a 80%) la scialorrea rappresenta il secondo effetto collaterale in ordine di frequenza e interessa circa il 25% dei pazienti. Si manifesta precocemente e in maniera particolarmente abbondante durante il sonno (Marinkovic et al., 1994). È stato evidenziato come la precoce insorgenza di scialorrea sia caratterizzata da un rapido incremento nelle prime 3 settimane di trattamento, seguito dallo sviluppo di tolleranza (Praharaj et al., 2010). La causa è da attribuirsi all'azione agonista svolta dalla clozapina sui recettori M4, prevalentemente presenti a livello delle ghiandole salivari (Zorn et al., 1994), in contrasto con l'azione antagonista a carico degli altri recettori muscarinici. È possibile gestire la scialorrea in modo abbastanza soddisfacente attraverso la somministrazione della minor dose possibile di clozapina (compatibilmente con l'efficacia terapeutica necessaria) o il ricorso a farmaci anticolinergici. È importante però ricordare che l'uso di anticolinergici in grado di oltrepassare la barriera emato-encefalica aumenta il rischio di sommazione degli effetti centrali. È stato proposto l'utilizzo di cerotti di scopolamina con buoni risultati (Dreyfuss et al., 1991). Efficace si è rivelato anche l'utilizzo di clonidina, anche in cerotti (Lieberman et al., 1998), mentre

le gocce oculari di atropina all'1% si sono rivelate utili per ridurre l'entità della scialorrea notturna, anche se il loro impiego è limitato da un effetto rebound di scialorrea nelle tarde ore del mattino (Antonello e Tessier, 2001).

Aumento di peso

L'incremento ponderale rappresenta un punto cruciale nella gestione della terapia con clozapina: clozapina ed olanzapina, infatti, sono gli antipsicotici che più di altri comportano aumento di peso (Rummel-Kluge et al., 2010). Nel periodo immediatamente successivo all'immissione sul mercato dell'antipsicotico il problema era stato sottovalutato, a fronte della consistente efficacia terapeutica nei casi di schizofrenia resistente e del fatto che altri farmaci antipsicotici fino a quel tempo avevano presentato tale problematicità, seppur in misura minore (ad es. le fenotiazine). Il meccanismo che porta all'aumento di peso è stato individuato da un lato nell'azione antiserotoninergica e antistaminica, dall'altro nella capacità di modificare le concentrazioni plasmatiche di cortisolo e glucosio (Meltzer, 1989; Cohen et al., 1990). È da sottolineare che anche la sedazione, con la correlata ipomobilità, può contribuire all'insorgenza dell'effetto avverso. Nel 1990 Cohen e colleghi hanno evidenziato un incremento in media di 3.20 kg in 6 pazienti su 7 in un periodo compreso tra 2 e 9 mesi di trattamento. In uno studio successivo, condotto su 99 pazienti in terapia con clozapina da almeno 3 mesi, è stato registrato un incremento ponderale in media di 5.4 kg nel 73% del campione, mentre nel 20% dei pazienti è stato rilevato un incremento ponderale superiore al 10% del peso valutato a inizio terapia (John et al., 1995). Numerosi altri studi e revisioni si sono concentrati su questo tema (Leadbetter et al., 1992; Lieberman et al., 2005; Dent et al., 2012) e tutti sottolineano, oltre alla frequenza ed entità del fenomeno, quanto l'aumento di peso possa giocare un ruolo importante nel

determinare una scarsa compliance alla terapia. Per contenere l'incremento ponderale, le conseguenti alterazioni metaboliche e per aumentare l'adesione alla terapia, è fondamentale fornire una adeguata consulenza in merito a norme dietetiche e abitudini di vita corrette. Può risultare utile una riduzione nella posologia di clozapina. Recenti studi suggeriscono la somministrazione di topiramato al fine di implementare l'efficacia terapeutica e ridurre l'incremento ponderale (Hahn et al., 2010).

Stipsi

La potente azione anticolinergica esercitata da clozapina sembrerebbe essere la causa della stipsi associata al trattamento (Cohen, 1990). Può essere efficacemente trattata tramite una dieta ricca di fibre, assunzione di liquidi, idratanti delle feci e lassativi. La costipazione non è comunque un evento da sottovalutare: sono stati riportati casi di ileo paralitico e ischemia intestinale conseguenti a costipazione in pazienti in terapia con clozapina (Nielsen e Meyer, 2010). Nel 2009 McKinnon e colleghi hanno descritto un caso di infarto intestinale in corso di terapia a lungo termine con clozapina. Nello stesso anno è stato riportato il caso clinico di un paziente che, dopo alcune settimane di trattamento, ha sviluppato la "Sindrome di Ogilvie", una pseudo-ostruzione intestinale acuta causata da un'alterazione del sistema nervoso autonomo deputato alla regolazione della motilità intestinale (de Bruin et al., 2009).

Il blocco dei recettori M_1 può causare anche xerostomia e disturbi dell'accomodazione (Miller et al., 2000).

È pertanto necessaria cautela nell'impiego di clozapina, in particolare in pazienti affetti da ipertrofia prostatica, glaucoma ad angolo chiuso e altri disturbi che possano risentire negativamente dell'azione anticolinergica dell'antipsicotico.

Nausea e vomito

Nonostante l'azione antiemetica legata al blocco dei recettori D_2 da parte degli antipsicotici, durante l'uso di clozapina è possibile che si manifestino nausea e vomito. L'insorgenza di tali effetti avversi, più che all'abbondante ingestione di saliva e all'azione diretta sul sistema gastroenterico, sembra correlata a un effetto centrale di stimolazione dopaminergica e/o serotoninergica presinaptica (Meltzer, 1990).

Ipertermia

Come altri antipsicotici, anche clozapina ha la capacità di interagire con il centro ipotalamico deputato alla termoregolazione. Durante le prime settimane di trattamento, infatti, può insorgere un'ipertermia benigna transitoria. L'aumento della temperatura è generalmente contenuto ($0.5-1.5^{\circ}\text{C}$) e si risolve spontaneamente entro qualche giorno senza la necessità di particolari interventi terapeutici. Anche se rari, sono noti casi in cui la temperatura ha raggiunto o superato stabilmente i 38.5°C : una tale evenienza impone la sospensione temporanea della somministrazione del farmaco.

Mioclono

Si tratta di un'evenienza riscontrata raramente in corso di terapia con clozapina. Insorge più frequentemente in pazienti con anamnesi positiva per episodi convulsivi e in coloro in cui la posologia è stata aumentata troppo rapidamente (Lieberman et al., 1989; Denney et al., 1995). Alcuni autori ritengono che possa essere considerato come un sintomo predittivo per l'insorgenza di future crisi di grande male (Berman et al., 1992). Da una revisione effettuata nel 2007, si evince che l'insorgenza di mioclono non è necessariamente correlata a dosaggi elevati: è stato infatti registrato in pazienti con dosaggio medio inferiore a 600 mg/die (Wong et al., 2007). In gran parte dei casi il

mioclono va incontro a remissione con la sola riduzione del dosaggio e senza la somministrazione di anticonvulsivanti. Raramente si rende necessaria la sospensione della terapia.

Sindrome maligna da neurolettici (SMN)

Si tratta di una reazione idiosincrasica e potenzialmente fatale ai neurolettici, riscontrata durante la monoterapia con clozapina (Anderson e Powers, 1991; Miller et al., 1991; Gupta e Nihalani, 2004), ma soprattutto in politerapia con altri antipsicotici. Da sottolineare la particolare correlazione con la somministrazione di litio (Pope et al., 1986; Mueller et al., 1988; Fava e Galizia, 1994). L'incidenza di SMN legata alla somministrazione di clozapina si attesta attorno all'1,4% (Pope et al., 1986) e a tutt'oggi resta più bassa rispetto al 3.3% delle terapie con antipsicotici tipici (Cvjetković-Bosnjak e Soldatović-Stajić, 2010). La sintomatologia descritta comprende ipertermia, tachicardia, ipertensione, tachipnea, diaforesi, alterazioni dello stato di coscienza, rigidità muscolare, leucocitosi, elevazione delle CPK. Sono stati riportati anche disartria, disfagia, segno di Babinski e convulsioni tonico-cloniche generalizzate (Rosebush et al., 1989; Jahan et al., 1992). Il meccanismo responsabile sembra essere legato al blocco dei recettori dopaminergici presenti nella via nigrostriatale e nei nuclei ipotalamici (Cvjetković-Bosnjak e Soldatović-Stajić, 2010). La sindrome insorge, nella maggior parte dei pazienti, entro le prime 2 settimane di trattamento, ma il rischio potenziale permane per tutta la durata della terapia (Jahan et al., 1992).

Effetti sul comportamento

Possono interessare pazienti suscettibili, soprattutto di età avanzata e comprendono confusione e, più raramente, delirium. La causa va ricercata nell'azione anticolinergica

di clozapina, così come nella sua eccessivamente rapida titolazione (Szymanski et al., 1991). Generalmente il delirium regredisce dopo riduzione della dose somministrata ovvero dopo la temporanea sospensione di clozapina con successiva graduale reintroduzione.

Studi epidemiologici recentemente aggiornati indicano che il 20-30% dei pazienti schizofrenici presenta sintomi ossessivo-compulsivi (*OCS*) che si associano a un impatto negativo sulla prognosi. A fronte di osservazioni e studi a lungo termine, alcuni autori suggeriscono che tali manifestazioni costituiscano effetti avversi degli antipsicotici di seconda generazione ad azione anticolinergica. Nel 2011 Schrimbeck e colleghi, con uno studio condotto su 70 pazienti suddivisi in 2 gruppi in base alla terapia assunta (gruppo I: clozapina o olanzapina; gruppo II: amisulpride o aripiprazolo), hanno dimostrato che all'interno del gruppo I il 71.8% presentava *OCS* rispetto al 9.7% dei pazienti del gruppo II. I risultati sono quindi fortemente suggestivi per una correlazione tra assunzione di clozapina e sviluppo di *OCS*. Gli stessi autori hanno riportato, inoltre, una correlazione positiva fra durata del trattamento e rischio di sviluppo di *OCS*.

Effetti sull'apparato endocrino

A differenza degli altri farmaci antipsicotici, clozapina non comporta un aumento dei livelli plasmatici di prolattina rilevante sul piano clinico. Grazie al debole blocco operato sui recettori D_2 , la riduzione dell'attività dopaminergica tuberoinfundibolare non è tale da alterare la secrezione di prolattina (Meltzer et al., 1979; Kane et al., 1981; Meltzer et al., 1991). Pertanto, il trattamento con clozapina risulta pressoché privo degli effetti secondari all'iperprolattinemia (amenorrea, galattorrea, riduzione della libido, ginecomastia e impotenza), rilevati invece durante la somministrazione di altri antipsicotici come risperidone e amisulpride (Rosenbloom, 2010).

Il trattamento con clozapina può indurre invece ipertrigliceridemia ed iperglicemia, con rilevante rischio di sviluppare sindrome metabolica (Pramyothin e Khaodhiar, 2010). Il farmaco è in grado di alterare il funzionamento insulinico: oltre a ridurre l'uptake di glucosio a livello cellulare, diminuisce del 60% l'azione dell'insulina sul proprio recettore e riduce del 40% l'effetto dell'insulina sulla tirosinchinasi.

Studi recentemente condotti hanno dimostrato un moderato aumento dell'incidenza di diabete mellito e sindrome metabolica associato ad assunzione di clozapina (Kessing et al., 2010; Grover et al., 2011). È doveroso sottolineare che, nella maggior parte dei pazienti che hanno sviluppato alterazioni metaboliche in corso di trattamento, sono stati identificati diversi fattori di rischio concomitanti quali sedentarietà, fumo, alcolismo, obesità, alterazioni sull'asse ipotalamo-ipofisi-surrene oltre a familiarità positiva per diabete mellito e dislipidemia (Grover et al., 2011). Nei soggetti in trattamento, la sindrome metabolica e le disregolazioni del metabolismo sono prevalentemente correlate all'incremento ponderale. In merito all'alterato metabolismo glucidico, invece, è evidente la correlazione positiva con la durata del trattamento. Da ciò deriva l'importanza di un costante controllo del peso corporeo per tutta la durata del trattamento e di un attento monitoraggio della glicemia, anche in assenza di incremento ponderale significativo (Bai et al., 2010).

Durante le prime fasi del trattamento, gli effetti di clozapina sull'introduzione di cibo e sul metabolismo periferico risultano avere una regolazione indipendente, ma con il progressivo incremento dell'adiposità corporea, il deterioramento del metabolismo periferico indotto da clozapina si rende manifesto; come conseguenza, si instaura un circolo vizioso nel quale gli effetti negativi di clozapina sul metabolismo vengono amplificati dalle ben note sequele fisiopatologiche dell'obesità (Teff e Kim, 2011).

Effetti da brusca sospensione

L'interruzione del trattamento con clozapina deve avvenire gradualmente e sotto attento monitoraggio, qualora consentito dalle condizioni cliniche del paziente (Cassano et al., 1996). Sono infatti ben documentati gli effetti avversi insorti a fronte di un'interruzione brusca della somministrazione: si può assistere all'insorgenza di una sindrome colinergico-serotoninergica con agitazione e confusione, discinesia, insonnia, cefalea, nausea, vomito, sudorazione, diarrea (Lieberman et al., 1989; Grover, 2010; Kumar et al., 2011). È possibile, inoltre, che si manifesti un rebound della sintomatologia psicotica. Nelle condizioni che richiedono una immediata interruzione del trattamento (ad es. in caso di neutropenia), è dunque fondamentale considerare l'eventuale insorgenza degli effetti avversi descritti.

Effetti extrapiramidali (EPS)

La caratteristica che differenzia clozapina dagli altri antipsicotici è la sua pressoché nulla correlazione con effetti secondari di tipo extrapiramidale (distonia acuta, parkinsonismo, acatisia, discinesia tardiva e distonia tardiva). Clozapina deve questa sua peculiarità in parte all'attività di antagonismo serotoninergico, ma, soprattutto, alla scarsa occupazione dei recettori D₂ e alla potente azione anticolinergica. In letteratura viene riportata un'incidenza di sintomi extrapiramidali come tremore (6%), acatisia (3%) e rigidità (3%) sovrapponibile a quella rivelata durante trattamento con placebo. Nella realtà clinica, però, i predetti sintomi non si manifestano quasi mai in monoterapia con clozapina; qualora questi siano presenti, devono essere considerati come eventi avversi conseguenti alle precedenti terapie con antagonisti dopaminergici. Tale constatazione deriva dal fatto che il tempo di dimezzamento della sindrome da impregnazione da farmaci neurolettici con associati effetti extrapiramidali corrisponde a

1-2 mesi (Haddad e Dursun, 2008). In conseguenza a questo, eventuali manifestazioni extrapiramidali non possono essere ricondotte specificatamente a clozapina prima che siano trascorsi almeno sei mesi di terapia.

Riduzione della massa ossea

La riduzione della massa ossea (e la conseguente aumentata incidenza di fratture) è ormai dimostrata in pazienti sottoposti a terapia a lungo termine con antipsicotici atipici. Inizialmente tale evenienza veniva considerata come conseguenza dell'iperprolattinemia indotta dalla terapia. Più di recente tale ipotesi è stata confutata, riportando invece una possibile correlazione positiva tra riduzione della massa ossea e sintomi negativi della schizofrenia stessa (Lee et al., 2010). Un'altra causa riportata è l'azione tossica diretta esercitata sul tessuto osseo. Studi sperimentali condotti su modelli murini, infatti, hanno dimostrato una riduzione della densità ossea pari al 15%, oltre alla riduzione del volume delle porzioni corticale e trabecolare dell'osso. In particolare, clozapina comporta un transitorio aumento dei livelli plasmatici di cortisolo, una riduzione di testosterone ed è in grado di ridurre la mitogenesi e la differenziazione di osteoblasti e osteoclasti. Risulta chiaro, quindi, come la prolungata somministrazione di clozapina possa influire negativamente sul benessere del tessuto osseo (Costa et al., 2010).

Enuresi

Episodi di enuresi notturna sono stati registrati in corso di terapia con clozapina con un'incidenza compresa tra il 6% ed il 44.3% (Lee e Kim, 2010). Il meccanismo alla base è stato identificato nell'incontinenza successiva alla ritenzione causata dall'azione antimuscarinica, antiadrenergica per recettori α_1 e colinomimetica di clozapina (Aronowitz et al., 1995; Poyurovski et al., 1996; Fuller et al., 1996). Inoltre, l'enuresi è

stata correlata anche agli effetti non specifici di clozapina come la sedazione, la costipazione e la riduzione della soglia convulsiva (Warner et al., 1994). Recenti studi hanno dimostrato come l'incidenza di enuresi notturna sia maggiore con l'utilizzo di clozapina rispetto ad altri antipsicotici quali olanzapina, risperidone, quetiapina (Harrison e Woolrych, 2011).

Effetti sul rene

Sono stati riportati casi di nefrite interstiziale e di insufficienza renale acuta a essa conseguente (Elias et al., 1999; Southall, 2000; Hunter et al., 2009). Si tratta di un'evenienza rara, ma potenzialmente fatale se non riconosciuta in tempo. Per tale motivo alcuni autori raccomandano la valutazione della funzionalità renale prima di intraprendere la terapia con l'antipsicotico e il monitoraggio durante il trattamento, al fine di poter prontamente interrompere la somministrazione in caso di alterazione dei parametri di funzionalità dell'organo emuntore (Kanofsky et al., 2011).

Effetti sul fegato

Sono stati riportati casi di epatite indotta da clozapina (Tatcher et al., 2005; Luo et al., 2007), ma solo due con evoluzione verso un'insufficienza epatica acuta con esito fatale (McFarlane et al., 1997; Chang et al., 2009). Il meccanismo attraverso il quale clozapina induce danno epatico è ancora sconosciuto: è stato ipotizzato che precedenti epatiti e alterazioni epatiche danneggino la via metabolica del citocromo P450, giocando un ruolo importante in merito. A tutt'oggi sono in corso studi per approfondire l'argomento. È possibile comunque affermare che l'innalzamento in circolo degli enzimi epatici può rappresentare un primo segnale di danno epatico indotto da clozapina: in tali casi, prelievi approfondite indagini diagnostiche volte a escludere altre

possibili cause, può essere opportuno ridurre il dosaggio del farmaco e, se necessario, sospenderne la somministrazione. Tali accorgimenti, infatti, in passato hanno impedito che iniziali alterazioni enzimatiche evolvessero in danno epatico franco (Chang et al., 2009).

DOSAGGIO TERAPEUTICO E CORRELAZIONE CON IL MONITORAGGIO CLINICO E PLASMATICO DELLA CLOZAPINA

È già stato descritto nei precedenti capitoli come l'impiego di clozapina nella pratica clinica sia fortemente influenzato, se non addirittura penalizzato, dalla sua scarsa maneggevolezza e dalla ancora elevata percentuale di pazienti non responders. Per rendere l'utilizzo clinico di clozapina il più sicuro possibile è importante innanzitutto conoscere la corretta modalità di titolazione del farmaco. La gestione del dosaggio si basa sull'incremento progressivo e la dose, stabilita in base al singolo paziente, deve corrispondere alla minima efficace.

In prima giornata la dose somministrata può variare da 12,5 a 25 mg, mentre dal secondo giorno il dosaggio può raggiungere i 50 mg/die. Se ben tollerata, la posologia giornaliera può essere incrementata gradualmente di 25-50 mg sino a raggiungere un valore di 300 mg/die nel giro di 2-3 settimane. In seguito, se necessario, la dose può essere aumentata di 50-100 mg ogni 3-4 giorni o, preferibilmente, a intervalli settimanali sino a raggiungimento della dose efficace. In Europa la dose minima efficace è considerata compresa tra 200 e 300 mg/die, mentre negli Stati Uniti sono utilizzati dosaggi superiori (400-600 mg/die). In caso di mancata risposta sui sintomi positivi e/o sui sintomi di disorganizzazione è considerato opportuno un incremento del dosaggio, sino a una dose massima giornaliera di 900 mg. Non sembra necessario, invece, aumentare il dosaggio in caso di sintomi negativi: infatti, questi ultimi mostrano un miglioramento soddisfacente anche a dosi relativamente basse (100-200 mg/die).

In caso di mancata risposta alla terapia è consigliato il monitoraggio dei livelli plasmatici di clozapina, poiché è ormai opinione condivisa tra i diversi autori che i livelli plasmatici del farmaco siano correlati con la risposta clinica.

Secondo una valutazione di Khan e colleghi, il monitoraggio clinico e plasmatico di un farmaco dovrebbe essere eseguito in presenza delle seguenti caratteristiche (Khan et al., 2005):

- meccanismi d'azione multipli;
- indice terapeutico ristretto;
- metabolismo complesso, caratterizzato da importante variabilità interindividuale.

La clozapina presenta ciascuna di queste caratteristiche per cui, sulla base di tali considerazioni, il suo monitoraggio plasmatico potrebbe essere giustificato nella pratica clinica.

Dai dati sino a oggi disponibili in letteratura emergono condizioni in cui il monitoraggio plasmatico di clozapina dovrebbe rendersi necessario:

- scarsa risposta clinica a dosaggi standard;
- presenza di eventi avversi o tossicità riconducibili ai livelli plasmatici (es. convulsioni, ipotensione, eccessiva sedazione);
- variazione del consumo abituale di caffeina e tabacco: è noto, infatti, che le concentrazioni plasmatiche di clozapina aumentano con l'assunzione di caffeina, mentre si riducono con l'assunzione di tabacco per effetto dell'induzione degli enzimi epatici;
- assunzione concomitante di farmaci che interagiscono con il sistema enzimatico del CYP 450 e con il CYP 1A2 in particolare;
- anamnesi positiva per patologie epatiche;
- scarsa aderenza alla terapia.

Nonostante dai primi studi effettuati non sembrasse esistere alcuna correlazione tra i livelli plasmatici dei farmaci antipsicotici e la risposta clinica (Ackenheil et al., 1976;

Thorup e Fog, 1977; Brau et al., 1978), studi più recenti hanno permesso di ipotizzare l'esistenza di un preciso rapporto in tal senso. In particolare per quanto riguarda la clozapina, alcuni lavori concordano nell'attribuire ai livelli plasmatici compresi tra 350-420 ng/ml un valore predittivo per risposta positiva alla terapia (Perry et al., 1991; Hasegawa et al., 1993; Potkin et al., 1994; Miller et al., 1996). Inoltre, sono stati riportati dati relativi all'aumento del rischio di effetti avversi a carico del sistema nervoso centrale (convulsioni, sedazione, confusione, delirium) per concentrazioni plasmatiche superiori a 1000 ng/ml (Freeman e Oyewumi, 1997).

In riferimento ai casi di pazienti non responders alla terapia con clozapina, Bell e colleghi definiscono la possibilità di un aumento del dosaggio giornaliero sino all'ottenimento di una risposta soddisfacente, a patto che non si superi il dosaggio massimo di 900 mg/die (Bell et al., 1998) e che, ovviamente, non si manifestino effetti avversi.

Nel 2008 questa posizione è stata messa in discussione. Maccal e colleghi, dopo aver rivalutato la letteratura disponibile dal 1997 al 2005 e aver considerato nel dettaglio tre casi clinici di pazienti trattati con dosi superiori a 900 mg/die, sono giunti alla conclusione che, in particolare in maschi fumatori, la somministrazione di dosi di clozapina sino a 1400 mg/die potrebbe risultare utile per la terapia. I soggetti di sesso femminile, invece, non sembrano trarre giovamento da dosaggi così elevati. Infine, gli autori consigliano il monitoraggio per tutti i pazienti che assumono clozapina a dosaggi pari o superiori a 600 mg/die (Maccal et al., 2008).

La notevole variabilità interindividuale nella risposta clinica alla clozapina e nella comparsa degli effetti avversi si correla spesso con il riscontro di livelli plasmatici molto differenti, seppur a parità di dosaggio. Inoltre, la discrepanza tra i livelli

plasmatici non si osserva soltanto tra soggetti diversi, ma anche nello stesso paziente che assume dosaggio fisso dopo alcune settimane di trattamento.

Le cause della variabilità nell'entità della risposta clinica e nel tempo necessario per ottenerla non sono ancora ben definite, ma è chiaro come i diversi livelli plasmatici possano giocare un ruolo importante in merito. Inoltre, alcuni autori ipotizzano che casi di mancata risposta alla terapia con clozapina siano correlati a bassi livelli plasmatici raggiunti allo steady-state (VanderZwaag et al., 1996).

Nel 2000 Spina e colleghi hanno condotto uno studio approfondito al fine di chiarire la correlazione tra concentrazioni plasmatiche di clozapina e risposta clinica. Nello studio sono stati valutati 45 pazienti (30 maschi e 15 femmine) di età compresa tra 19 e 65 anni, trattati per 12 settimane con clozapina a dosi superiori a 500 mg/die. Al termine della dodicesima settimana di trattamento sono stati determinati i livelli plasmatici di clozapina e del metabolita norclozapina allo steady-state. Inoltre, all'inizio del trattamento e alla dodicesima settimana, i pazienti sono stati sottoposti a una valutazione psicotologica mediante la somministrazione della Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS). I risultati ottenuti stabiliscono quanto segue:

- la concentrazione plasmatica di clozapina risulta in media più elevata nei pazienti che rispondono positivamente al trattamento;
- i livelli plasmatici di norclozapina non presentano differenze significative tra i diversi soggetti;
- è stata riscontrata correlazione positiva tra miglioramento nel punteggio della BPRS e livelli plasmatici di clozapina.

Dai risultati di questo studio gli autori hanno concluso che sia la comparsa di reazioni avverse che l'efficacia antipsicotica si correlano positivamente con i livelli plasmatici raggiunti.

Comunque, nonostante i numerosi dati in merito, non è stato ancora possibile definire con certezza per la concentrazione plasmatica di clozapina un cut-off che distingua i pazienti responders dai non responders. Inoltre in letteratura sono ancora pochi i dati disponibili in merito ai livelli plasmatici di clozapina che dovrebbero essere considerati tossici. Uno studio di Ulrich e colleghi nel 2003 ha riportato che sussiste un basso rischio di ricaduta per concentrazioni plasmatiche superiori a 200 ng/ml, mentre è possibile un aumento del rischio di tossicità per valori superiori a 750 ng/ml. Risultati analoghi sono stati confermati da uno studio più recente di Xiang et al., 2006.

III. LA VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA

Nella pratica clinica è possibile osservare una notevole variabilità interindividuale nella risposta a un farmaco con un *range* che spazia dalla mancanza di effetti clinici alla comparsa di eventi avversi o di effetti tossici. Spesso le cause di questa variabilità vanno ricercate nella differente efficienza con cui avviene il processo di biotrasformazione epatica, principale meccanismo con il quale viene regolata la concentrazione del farmaco nell'organismo e quindi, secondariamente, nel sito d'azione recettoriale.

Un'altra causa della diversità tra gli outcome clinici può essere individuata nelle variazioni a carico del sistema di trasporto transmembrana del farmaco. In entrambe le circostanze si può infatti verificare una modificazione della biodisponibilità di un farmaco nell'organismo.

IL SISTEMA DELLE PROTEINE TRASPORTATRICI

Le proteine trasportatrici localizzate a livello della membrana cellulare sono in grado di influenzare significativamente il trasporto dei substrati attraverso le barriere cellulari. All'interno del genoma umano, una delle più importanti famiglie di geni codificanti proteine di trasporto è la superfamiglia dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette transporters). Tra questi sono stati identificati 49 geni, suddivisi in sette sotto-famiglie: da ABCA ad ABCG (Choudhuri e Klaassen, 2006; Sharom, 2008). Particolarmente importante ai fini dello studio della variabilità del profilo farmacocinetico interindividuale della clozapina, è il ruolo svolto dalla Glicoproteina-P e, in misura minore, dalla Breast Cancer Resistance Protein.

Glicoproteina-P

La Glicoproteina-P (PGP) è il prodotto genico di ABCB1 (o MDR1). Si tratta di una proteina di membrana di 170 kDa appartenente alla superfamiglia dei trasportatori ABC e insieme al canale hERG per il potassio e al CYP3A4, è il target più studiato in farmacogenetica a causa del fondamentale ruolo che ricopre nella risposta clinica di diversi farmaci.

La Glicoproteina-P agisce come pompa di efflusso che, traendo l'energia necessaria dall'idrolisi di ATP, è in grado di estrarre i propri substrati all'esterno della cellula con un trasporto contro gradiente. Dal punto di vista strutturale ABCB1 è composta da sei domini transmembrana e un sito di legame ATP.

La localizzazione a livello di organi escretori come rene e fegato, oltre a barriera emato-encefalica e mucosa intestinale, facilita la comprensione del meccanismo d'azione del trasportatore che si esplica attraverso tre vie:

1. regolazione dell'assorbimento intestinale ed eliminazione attraverso le feci;
2. eliminazione attiva tramite l'emuntorio renale ed epatico;
3. regolazione e limitazione della diffusione ai tessuti, resa possibile grazie alla localizzazione a livello di barriera emato-encefalica, testicolo e placenta.

Si può ragionevolmente affermare, dunque, che la proteina svolga una importante funzione di protezione nei confronti sia di xenobiotici, sia di substrati endogeni. In pazienti gravide sottoposte a terapia farmacologica, tale ruolo protettivo si rivela fondamentale anche nei confronti del feto. (Ni e Mao, 2011).

L'attività della Glicoproteina-P appare, inoltre, correlata a quella del CYP3A4: è stato osservato che le due strutture, oltre a essere espresse simultaneamente in alcuni tessuti, riconoscono substrati comuni (Broccatelli et al., 2012). I substrati della PGP comprendono ormoni steroidei, agenti antimicrobici, oppioidi, agenti antitumorali,

immunosoppressori e farmaci attivi sul sistema nervoso centrale (Cascorbi e Haenisch, 2010; Fromm, 2004).

Breast Cancer Resistance Protein

La Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) è una proteina di 655 aminoacidi, il cui gene codificante ABCG2, composto da 16 esoni e 15 introni, è localizzato sul cromosoma 4. La sua struttura comprende una estremità N-terminale e sei segmenti C-terminali transmembrana. L'attività di BCRP, ancor più della PGP, è caratterizzata dalla capacità di trasporto di numerose sostanze, anche molto differenti tra loro. La proteina è certamente nota soprattutto per la sua attività di trasporto di agenti chemioterapici, che ne rappresentano il substrato principale, ma la sua attività si esplica anche nei confronti di altri composti chimici come antibiotici, inibitori della HMG-CoA reduttasi, antistaminici e molte altre sostanze.

La localizzazione di BCRP nell'organismo è molto varia. Nel 1998, anno della sua scoperta, Doyle e colleghi ne dimostrarono la presenza a livello del midollo osseo, sulla membrana delle cellule staminali, ipotizzando un ruolo protettivo nei confronti di queste ultime. I diversi studi condotti negli anni successivi hanno permesso di chiarire meglio il ruolo di BCRP. Così come per la PGP, la sua presenza anche a livello di intestino, fegato, reni, barriera emato-encefalica e placenta dimostra come la proteina svolga un ruolo di protezione per l'organismo nei confronti di numerosi xenobiotici e di regolazione dell'omeostasi cellulare e della distribuzione dei farmaci nel corpo (Maliepaard et al., 2001; Robey et al., 2009; Sarkadi et al., 2010).

Per quanto riguarda l'interazione tra BCRP e farmaci antipsicotici a oggi non esiste ancora una opinione unica e condivisa. Diversi studi hanno dimostrato l'esistenza di una azione inibitoria esercitata dagli antipsicotici nei confronti della BCRP. In particolare,

Wang e colleghi hanno sottolineato come clozapina, risperidone e clorpromazina esercitino una potente inibizione nei confronti della proteina di trasporto, mentre aloperidolo e quetiapina sembrano avere un ruolo marginale in questo senso (Wang et al., 2008). Recentemente, Nagasaka e colleghi hanno individuato in aripiprazolo un ulteriore potente inibitore della BCRP.

Dai dati fino a oggi acquisiti si evince come, pur non essendo substrati diretti della proteina, i farmaci antipsicotici possano giocare un ruolo significativo nella regolazione dell'attività della BCRP e come questa interazione possa avere ripercussioni sulla distribuzione e concentrazione dei farmaci stessi nell'organismo.

L'ampio spettro d'azione e la notevole influenza dimostrata su biodisponibilità, concentrazione plasmatica e manifestazione di reazioni avverse ai farmaci, rendono la Glicoproteina-P e la BCRP un interessante oggetto di studio in ambito farmacogenetico. In particolare, le numerose ricerche condotte si concentrano sullo studio dei polimorfismi dei geni ABCB1 e ABCG2 codificanti per le suddette proteine di trasporto. Per una descrizione più dettagliata di questo argomento si rimanda al capitolo successivo.

IL SISTEMA ENZIMATICO DEL CITOCROMO P450

Le biotrasformazioni subite da un farmaco nell'organismo umano sono molteplici e finalizzate, oltre che all'immissione in circolo, alla sua corretta eliminazione.

Le reazioni enzimatiche che operano le diverse trasformazioni metaboliche sono suddivise in due fasi:

- reazioni di Fase I: comprendono ossidazione, riduzione e idrolisi. Sono definite anche reazioni di “funzionalizzazione” in quanto, oltre a inattivare la molecola, hanno lo scopo di inserire o mettere in evidenza gruppi funzionali di legame, fondamentali per le successive reazioni di coniugazione.
- reazioni di Fase II: includono glucuronazione, acetilazione, solfatazione, metilazione. Tali reazioni sfruttano i predetti gruppi funzionali di legame al fine di coniugare il substrato con diverse molecole.

Nelle reazioni di fase I il ruolo principale è svolto dal sistema enzimatico del citocromo P450, una catena enzimatica a trasporto elettronico situata sulla membrana microsomiale del reticolo endoplasmico o, in alcuni casi, sulla membrana mitocondriale interna prevalentemente a livello epatico, ma presente anche in tessuti extraepatici quali rene, polmone, tratto gastrointestinale, sistema nervoso centrale, placenta e cute (Jacob, 2009).

L'importanza del sistema del citocromo P450 per l'organismo umano è testimoniata dalla sua longevità: la sua origine risale, infatti, a oltre 3 miliardi di anni fa e da allora la sua evoluzione è stata continua. Le diverse isoforme che sino a ora si sono differenziate, consentono la biotrasformazione e l'eliminazione di una vasta gamma di composti chimici di origine sia endogena che esogena (Dandara et al., 2011).

Il complesso sistema enzimatico del citocromo P450 si è evoluto grazie alle continue replicazioni geniche e, probabilmente, attraverso fenomeni genici di amplificazione, delezione e traslocazione (Werck-Reichhart e Feyereisen, 2000). L'impiego di tecniche a DNA ricombinante ha consentito di definire più nel dettaglio le caratteristiche della superfamiglia genica del citocromo P450 (CYPs). In essa sono comprese diverse famiglie, ciascuna suddivisa a sua volta in numerose sottofamiglie. Nell'uomo sono state individuate fino a oggi 12 famiglie di geni codificanti il citocromo P450, con la

possibile coesistenza di due o più sistemi enzimatici all'interno della stessa cellula. Le isoforme enzimatiche maggiormente coinvolte nei processi di biotrasformazione sono codificate dalle famiglie 1, 2, 3, 4 del citocromo (CYP1, CYP2, CYP3, CYP4). L'omologia nelle catene amminoacidiche tra le diverse famiglie è superiore al 40%, mentre all'interno di una stessa famiglia può raggiungere il 60% (Oinonen e Lindros, 1998). La nomenclatura del sistema enzimatico del citocromo P450 prevede la sigla "P450" seguita dal numero arabo, una lettera alfabetica e un secondo numero arabo, indicanti rispettivamente famiglia, sottofamiglia ed enzima (es. CYP450 1A2, CYP450 2D6, etc.).

La biotrasformazione di un farmaco può subire variazioni da soggetto a soggetto in base all'efficacia e alla velocità con cui lavora il citocromo P450. Tali differenze metaboliche interindividuali possono essere ricondotte a:

- fattori fisiologici: età e sesso del soggetto;
- fattori patologici: malattie epatiche;
- fattori ambientali: tabagismo, assunzione di sostanze alcoliche e/o di caffeina;
- interazioni con altri farmaci o composti chimici;
- fattori genetici.

Quando si utilizza un farmaco poco maneggevole come la clozapina, identificare e chiarire gli elementi che concorrono a determinare le variazioni intersoggettive nella risposta al farmaco può rivelarsi di particolare importanza ai fini di ottimizzare e "individualizzare" il trattamento.

Dopo somministrazione orale di clozapina, la biodisponibilità media varia dal 27% al 47%, con una variabilità interindividuale del 78% circa (Cheng et al., 1988; Choc et al., 1990). Potkin (1994) ha osservato che, durante un trattamento cronico con clozapina, a causa delle differenze di biodisponibilità e di clearance del farmaco, le concentrazioni

plasmatiche della molecola possono presentare una variabilità interindividuale anche di 45 volte.

In questa tesi l'attenzione verrà dedicata alle caratteristiche del CYP450 1A2, poiché è stato dimostrato il suo fondamentale ruolo nel metabolismo della clozapina, sia *in vitro* che *in vivo* (Dahl, 2002; Klein et al., 2010).

Il citocromo P450 1A2 è una delle principali isoforme del sistema enzimatico CYP450, costituisce il 13% del pool epatico di questo gruppo di enzimi (Shimada et al., 1994) ed è coinvolto nel metabolismo di circa il 5-10% dei principali farmaci attualmente in uso, tra cui clozapina, imipramina, duloxetina, fluvoxamina, teofillina, paracetamolo, fenacetina e taurina (Klein et al., 2010). L'attività del CYP1A2 è stata dimostrata anche nell'attivazione di sostanze quali amine aromatiche e idrocarburi aromatici policiclici, e quindi è coinvolto nella carcinogenesi da sostanze tossiche, come nel caso del fumo di sigaretta (Boobis et al., 1994; Eaton et al., 1995; Kim e Guengerich, 2005).

Come per altri enzimi, anche per il CYP1A2 sono stati evidenziati diversi fattori in grado di influenzarne l'attività. I principali tra questi verranno di seguito considerati nel dettaglio, anche in relazione alla loro capacità di modificare la biotrasformazione di clozapina e, di conseguenza, determinare una variabilità nella risposta al trattamento.

FATTORI FISIOLGICI: ETÀ E SESSO

L'attività enzimatica e le reazioni di biotrasformazione dei farmaci variano in base all'età dell'individuo. Già durante la fase dello sviluppo fetale è possibile individuare in maniera distinta gli enzimi funzionali del citocromo P450, nonostante l'attività registrata sia inferiore a quella del periodo postnatale. I neonati sono in grado di catalizzare la gran parte delle reazioni metaboliche di fase I in maniera efficace, seppur

con attività più lenta rispetto a quella riscontrata nell'adulto. Infatti, la maturazione degli enzimi coinvolti nelle reazioni di fase I e II avviene in maniera graduale dalla seconda settimana di vita extrauterina. Con l'avanzare dell'età, soprattutto in adulti di età superiore a 60 anni, si assiste alla progressiva riduzione della massa epatica, del flusso ematico e dell'attività enzimatica. Tali trasformazioni, per quanto fisiologiche, incidono in maniera sostanziale sui processi di biotrasformazione dei farmaci, riducendone l'efficacia in misura tanto maggiore quanto più è elevato il coefficiente di estrazione epatica (Quartesan et al., 2002).

Le differenze di genere rappresentano un secondo importante fattore fisiologico. L'attività media del CYP1A2 risulta essere inferiore nel sesso femminile rispetto al sesso maschile (Cooper et al., 1994; Soldin et al., 2010). Inoltre, in alcuni studi (condotti sia su modelli murini che su soggetti umani) è riportato che lo stato di gravidanza e l'assunzione di contraccettivi orali si associano a una riduzione dell'attività enzimatica (Kalow e Tang, 1991; Bologna et al., 1991; Koh et al., 2011).

FATTORI PATOLOGICI

Esistono condizioni patologiche, in particolare epatiche, associate alla riduzione dell'attività enzimatica del citocromo P450. In diversi studi è stata riportata una chiara correlazione fra il decremento dell'attività di CYP1A2 e la presenza di cirrosi epatica e colangite sclerosante (George et al., 1995; Congiu et al., 2002). Un'altra importante associazione è stata individuata con steatosi epatica sia di origine alcolica che non alcolica e con le epatiti (Bechtel et al., 2000; Lelouët et al., 2001; Villeneuve e Pichette, 2004; Fisher et al., 2009).

La riduzione dell'attività enzimatica di CYP450 secondaria a un danno epatico può avere ripercussioni negative sulla risposta alla terapia: infatti, i farmaci che per il loro metabolismo dipendono dall'integrità della funzionalità epatica, andranno incontro a una ridotta biotrasformazione ed eliminazione, con conseguente innalzamento delle concentrazioni plasmatiche e rischio di accumulo e tossicità.

FATTORI AMBIENTALI

Alcuni fattori comportamentali e abitudini di vita sono ritenuti in grado di interferire con il metabolismo della clozapina. In particolare, anche a fronte della maggiore diffusione tra pazienti psichiatrici, suscitano interesse il tabagismo e l'assunzione di caffeina in quantità eccedente la media.

Tabagismo

Gli idrocarburi policiclici aromatici, prodotti dalla combustione incompleta, oltre a essere i maggiori carcinogeni riscontrati nel fumo di tabacco, sono anche potenti induttori dell'enzima CYP1A2 (Zevin e Benowitz, 1999). Come conseguenza, le concentrazioni plasmatiche dei farmaci metabolizzati da CYP1A2 possono risultare decisamente più basse in soggetti fumatori rispetto ai non fumatori.

Per quanto riguarda clozapina, sembra che gli effetti di induzione enzimatica siano più manifesti in soggetti fumatori di sesso maschile, con concentrazioni plasmatiche pari al 67% circa delle concentrazioni rilevate in maschi non fumatori (Haring et al., 1989; Hasegawa et al., 1993). Ulteriori studi hanno dimostrato che il consumo di oltre 30 sigarette al giorno si associa a una decisa riduzione della concentrazione plasmatica di clozapina, a dosaggio giornaliero di 100 mg (Diaz et al., 2005). Non sono state invece

riscontrate differenze significative nelle concentrazioni plasmatiche tra fumatori e non fumatori per dosaggi giornalieri di clozapina compresi fra 300 mg e 600 mg (Kroon, 2007).

Per contro, la cessazione dell'abitudine al fumo si correla con il decremento dell'induzione del CYP1A2, al quale può far seguito l'aumento della concentrazione plasmatica di clozapina in un tempo variabile da pochi giorni ad alcune settimane, con il rischio di comparsa di effetti tossici (Selby, 2006). A tal proposito, è stato descritto il caso di un paziente in terapia con clozapina che, poche settimane dopo aver smesso completamente l'abitudine al fumo di sigaretta, ha sviluppato crisi epilettiche generalizzate e convulsioni miocloniche (McCarthy, 1994). In uno studio condotto su 11 pazienti, l'interruzione del fumo di sigaretta ha portato a un incremento medio del 72% dei livelli plasmatici di clozapina. Tra questi, i pazienti soggetti all'incremento maggiore hanno mostrato una più alta frequenza di reazioni avverse (Meyer, 2001). Una recente review sottolinea quanto sia importante la gradualità dell'interruzione dell'uso di tabacco: gli autori hanno rilevato come, nonostante la riduzione del dosaggio, la concentrazione plasmatica di clozapina sia aumentata (superando anche i 1000 µg/l) nei casi di brusca interruzione del tabagismo. Gli stessi autori raccomandano un attento monitoraggio e, se necessario, l'aggiustamento della dose giornaliera di clozapina nei 6 mesi successivi la cessazione dell'abitudine al fumo (Cormac et al., 2009).

Assunzione di caffeina

La caffeina rappresenta un substrato del CYP1A2 e, pertanto, può interferire con la biotrasformazione di clozapina in quanto compete con essa per il sito di legame all'enzima (Vainer e Chouinaard, 1994). Tale interferenza si verifica prevalentemente per assunzione di caffeina pari a 400-1000 mg al giorno (Hagg et al., 2000; de Leon,

2004). Attraverso la misurazione dei metaboliti della caffeina nelle urine è possibile studiare l'attività del CYP1A2 *in vivo* ed effettuarne la fenotipizzazione (Bertilsson et al., 1994; Nordmark et al., 1998; Perera et al., 2012).

INTERAZIONI FARMACOLOGICHE

L'impostazione di una terapia che preveda la somministrazione di più farmaci è spesso necessaria per ottenere l'effetto terapeutico desiderato e per il trattamento di eventuali patologie concomitanti, soprattutto in caso di quadri psichiatrici complessi.

La polifarmacoterapia impone al clinico di considerare le diverse possibili interazioni farmacologiche, al fine di evitare l'insorgenza di effetti avversi e inficiare quindi l'utilità del trattamento.

Esistono due differenti tipologie di interazioni farmacologiche: interazioni farmacodinamiche e farmacocinetiche.

Le *interazioni farmacodinamiche* avvengono quando due o più sostanze condividono i medesimi siti d'azione recettoriali. La contemporanea presenza di più sostanze a livello dei recettori può determinare effetti sinergici, additivi o antagonisti.

Le *interazioni farmacocinetiche* possono essere complesse e difficili da prevedere. Esse sono dovute ad alterazioni di assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione dei farmaci e/o dei loro metaboliti e modificano la quantità e la permanenza del farmaco a livello dei siti recettoriali. Tali alterazioni interessano l'entità e la durata dell'azione farmacologica, ma non la tipologia di effetto.

In particolare, in merito alle interazioni metaboliche possono verificarsi fenomeni di *inibizione* e *induzione* enzimatica soprattutto a carico del sistema del CYP 450 (Lin e Lu, 1998).

Il fenomeno di *inibizione* si verifica quando due o più farmaci vengono metabolizzati da parte dello stesso enzima. Si genera in tal caso una competizione per il legame allo stesso sito enzimatico con riduzione del metabolismo della sostanza che possiede minore affinità. I meccanismi di inibizione delle isoforme del citocromo P450 vengono classificati come reversibili, parzialmente reversibili e irreversibili a seconda del tipo di interazione che si instaura fra enzima e substrato (Halpert, 1995; Ortiz de Montellano, 1995; Lee et al., 2012).

Per contro, alcune sostanze sono in grado di *indurre* l'attività enzimatica dei citocromi, sia a livello epatico che extraepatico. A differenza dell'inibizione, che risulta essere pressochè immediata, il fenomeno dell'induzione enzimatica è lento e graduale e può portare alla riduzione dei livelli plasmatici di un farmaco, compromettendone l'efficacia terapeutica. Il meccanismo responsabile è l'aumento della trascrizione genica e, di conseguenza, della quantità di enzima. Secondo alcuni autori, esiste la concreta possibilità che il processo di induzione, potenziando l'attività enzimatica detossificante, rappresenti un meccanismo protettivo attuato dall'organismo nei confronti di xenobiotici potenzialmente lesivi (Okey, 1990; Lin e Lu, 1998).

Un recente studio (Zhu, 2010) condotto sui meccanismi di induzione del citocromo P450 ha permesso di osservare che:

- l'isoforma enzimatica indotta dopo l'esposizione a un composto chimico è molto spesso quella con maggiore attività metabolica nei confronti della sostanza stessa;

- generalmente si ha l'induzione di più di una isoforma enzimatica contemporaneamente, anche se in diversa misura;
- il grado di induzione di una isoforma dei citocromo P450, seppur a fronte dell'esposizione al medesimo induttore, varia spesso in maniera sostanziale tra tessuti e organi diversi.

Le conseguenze più importanti dell'induzione enzimatica dei citocromi nella terapia farmacologica sono:

- a) incremento del metabolismo del farmaco con conseguente riduzione degli effetti farmacologici;
- b) riduzione della tossicità per accelerata detossificazione degli intermedi metabolici, oppure aumentata tossicità in caso di maggiore produzione di metaboliti attivi.

In ogni caso, i fenomeni di induzione o di inibizione dell'attività enzimatica possono tradursi nella variazione della disponibilità di farmaco nell'organismo la quale, a sua volta, può compromettere l'efficacia del trattamento: infatti, un aumento della concentrazione plasmatica di farmaco può portare a un incremento degli effetti avversi o dei fenomeni di tossicità, mentre la sua riduzione si può correlare a una scarsa, se non addirittura nulla, risposta clinica.

Le numerose interazioni farmacologiche della clozapina possono essere ricondotte ad alcune voci principali, riassunte in **Tabella 4**.

Innanzitutto, data la dimostrata correlazione fra clozapina e agranulocitosi, è controindicata l'associazione con farmaci con effetto mielotossico, quali carbamazepina, cloramfenicolo, sulfonamidi, analgesici pirazolinici, penicillamine, farmaci atitiroidei (Pancheri, 2007).

Nell'ambito delle interazioni farmacodinamiche, la clozapina può potenziare gli effetti centrali di alcool, inibitori delle MAO, antistaminici e benzodiazepine. Per l'associazione con queste ultime è richiesta particolare cautela. In letteratura, infatti, diversi studi riportano come l'associazione tra clozapina e benzodiazepine aumenti il rischio di insorgenza di atassia, sedazione, ipersalivazione e delirium; tale sintomatologia può sfociare in una insufficienza cardiaca e, in una minoranza di casi, in arresto cardiaco e morte improvvisa (Cobb et al., 1991; Bredbacka et al., 1993; Klimke e Klieser, 1994; Jackson et al., 1995; Chong e Remington, 2000).

Sono noti effetti additivi anche con la co-somministrazione di farmaci antipertensivi e anticolinergici.

Le interazioni di maggiore interesse per la gestione della clozapina in ambito clinico sono quelle di tipo farmacocinetico, in gran parte giustificate dall'elevato legame tra clozapina e le proteine plasmatiche: infatti, l'assunzione contemporanea di farmaci con elevato legame proteico (ad es. il warfarin) può risultare in un aumento della concentrazione plasmatica di clozapina. Al contrario, clozapina può spiazzare alcune sostanze dal sito di legame alle proteine plasmatiche, portando a un'elevazione della loro concentrazione plasmatica, con conseguente aumento degli effetti avversi e/o tossici.

Ai fini dello studio descritto in questa tesi, sono di particolare interesse le interazioni di clozapina con farmaci o sostanze in grado di interferire con l'attività enzimatica del CYP1A2, che possono dunque tradursi in alterazioni della concentrazione plasmatica dell'antipsicotico.

Tra i farmaci induttori enzimatici rivestono particolare interesse per la loro interazione con clozapina sono i farmaci antiepilettici. La fenitoina e in misura maggiore il valproato incrementano il metabolismo di clozapina, riducendone le concentrazioni

plasmatiche e, di conseguenza, l'efficacia terapeutica (de Leon et al., 2012). Carbamazepina e fenobarbital inducono sia il CYP1A2 che il CYP3A4 con notevole influenza sulla terapia con clozapina. Due studi condotti tra il 1994 ed il 1995 hanno sottolineato come l'associazione di carbamazepina e clozapina possa portare ad una riduzione dei livelli plasmatici dell'antipsicotico anche del 50% rispetto alla monoterapia (Jerling et al., 1994; Tiihonen et al., 1995). Successivamente, in uno studio condotto su due gruppi di pazienti, uno in monoterapia con clozapina ed uno in terapia con clozapina e fenobarbital, le concentrazioni plasmatiche di clozapina nei pazienti in politerapia sono risultate inferiori del 35% rispetto al gruppo di controllo (Facciola et al., 1998).

Una seconda classe di farmaci in grado di influenzare l'attività del citocromo è rappresentata dagli inibitori di pompa protonica. Tra questi, l'omeprazolo si comporta da induttore di CYP1A2. Nel 2003 Frick e colleghi hanno rilevato come l'associazione di clozapina e omeprazolo si associa a una riduzione del 40% circa dei livelli plasmatici dell'antipsicotico, in confronto alle concentrazioni di pazienti in monoterapia. Comunque, a una metanalisi dei dati disponibili in letteratura è emerso che l'effetto di induzione esercitato da omeprazolo risulta significativo soltanto nei pazienti con abitudine al fumo di sigaretta (Mookhoek e Loonen, 2004).

L'antistaminico cimetidina si comporta da inibitore enzimatico del CYP1A2, con possibile incremento delle concentrazioni plasmatiche di clozapina e conseguente rischio di manifestazioni avverse (Cassano et al, 1996).

Sono state registrate interazioni nel metabolismo di clozapina anche da parte di alcuni agenti antimicrobici. L'eritromicina, appartenente alla classe dei macrolidi, esercita una azione inibitoria sul CYP3A4, favorendo l'accumulo ematico di clozapina. Due casi clinici riportati in letteratura descrivono la comparsa, dopo introduzione di eritromicina,

di sintomi quali vertigini, sonnolenza, disorientamento e convulsioni in pazienti in terapia con clozapina. Tali sintomi sono andati incontro a remissione spontanea dopo la sospensione dell'antibiotico (Fundenburg et al., 1994; Cohen et al., 1996). Uno studio successivo, però, ipotizza che tale interazione non intervenga a dosaggi ridotti di clozapina; infatti, la contemporanea somministrazione a 12 volontari di clozapina a basso dosaggio (12.5 mg/die) ed eritromicina (1500 mg/die) non ha portato a un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche di antipsicotico. Per tale motivo, gli autori suggeriscono di considerare marginale il ruolo di inibizione enzimatica svolto da eritromicina (Hägg et al., 1999). La ciprofloxacina, un fluorochinolone, inibisce il CYP1A2: da uno studio condotto su 7 pazienti schizofrenici in terapia con clozapina è emerso che la contemporanea somministrazione di ciprofloxacina in dose pari a 500 mg/die, si accompagna a un incremento del 29% dei livelli plasmatici di clozapina e del 31% di norclozapina (Raaska e Neuvonen, 2000). Un caso clinico descritto recentemente confermerebbe tale correlazione (Espnes et al., 2012). Infine, la rifampicina mostra attività induttrice su CYP1A2 e CYP3A4; in un caso clinico del 1998, si descrive come un paziente schizofrenico, trattato con successo con clozapina, abbia mostrato una importante regressione della sintomatologia dopo introduzione di rifampicina in terapia (Joos et al., 1998).

È stato recentemente ipotizzato che anche i farmaci contraccettivi orali possano interferire con il metabolismo di clozapina; essi, infatti, eserciterebbero una azione di induzione enzimatica sui citocromi 1A2, 2C19 e 3A4 con conseguente riduzione dei livelli plasmatici di clozapina (Gabbay e O'Dowd, 2002).

In merito ai farmaci di interesse psichiatrico, sono a oggi registrate numerose interazioni farmacologiche tra clozapina e diversi principi attivi, nella maggior parte dei casi antidepressivi appartenenti alla classe degli SSRI.

Studi approfonditi sono stati condotti su paroxetina e fluoxetina per la loro azione inibitoria sul CYP2D6 e su fluvoxamina per l'inibizione esercitata sul CYP1A2 e CYP2C19. Inoltre, fluoxetina e fluvoxamina inibiscono l'attività del CYP3A4 (McGinnity et al., 2006).

Nonostante l'inibizione del CYP2D6 da parte di paroxetina sia ormai dimostrata, i dati riportati in letteratura in merito all'interazione con il metabolismo di clozapina sono contrastanti. Secondo alcuni autori, l'aggiunta di 20 mg/die di paroxetina alla terapia con clozapina si traduce in un aumento dei livelli plasmatici di antipsicotico pari al 20-40% (Centorrino et al., 1996; Spina et al., 2000); da altri studi, invece, emerge che tale incremento è da considerarsi non significativo (Wetzel et al., 1998; Gupta, 2008).

Per quanto riguarda fluoxetina, la co-somministrazione con clozapina si accompagna a un incremento del 40-70% dei livelli plasmatici di quest'ultima, a dimostrazione della potente azione inibitoria sul CYP2D6 (Centorrino et al., 1994; Spina et al., 1998; Haduch et al., 2010). Dai numerosi studi condotti, risulta essere molto più marcata l'influenza esercitata sul metabolismo di clozapina dalla fluvoxamina. La somministrazione contemporanea dei due farmaci, infatti, determina un incremento di 5-10 volte dei livelli plasmatici dell'antipsicotico (Hiemke et al., 1994; Jerling et al., 1994; Dequardo e Roberts, 1996; Dumortier et al., 1996; Koponen et al., 1996; Wetzel et al., 1998; Szegedi et al., 1999; Fabrazzo et al., 2000). Anche la sertralina sembra interferire con il metabolismo di clozapina attraverso l'inibizione del CYP2D6. Due studi hanno dimostrato un incremento dei livelli plasmatici di clozapina se associata alla somministrazione di sertralina alla dose di 50 mg/die (Chong et al., 1997) e di 300 mg/die (Pinniti e de Leon, 1997). Citalopram ed escitalopram, infine, non sembrano possedere significativa attività di inibizione enzimatica del citocromo P450; è, infatti, ancora da dimostrare l'effettivo ruolo svolto da citalopram nell'incremento dei livelli

plasmatici di clozapina in un caso clinico riportato in letteratura (Borbe e Henderson, 2000).

Nel complesso, da quanto riportato in letteratura, si può comunque osservare che la co-somministrazione di clozapina e antidepressivi SSRI si correla quasi sistematicamente con l'incremento dei livelli plasmatici di clozapina, con il conseguente aumento di reazioni avverse quali scialorrea, sedazione e ipotensione ortostatica sino a giungere, nei casi più severi, a una vera e propria sindrome colinergica (Markowitz et al., 1996; Lammers et al., 1999).

L'associazione di clozapina e SSRI in terapia deve essere dunque attentamente ponderata per ogni singolo paziente; nel caso in cui si decida di impostare una terapia associata, è necessario monitorare attentamente il paziente e considerare, laddove necessario, l'opportunità della riduzione del dosaggio di clozapina.

Sempre in merito ai farmaci antidepressivi, è stata segnalata la correlazione tra somministrazione concomitante di clozapina ed antidepressivi triciclici e la comparsa di sindrome colinergica.

Nonostante l'interazione metabolica tra farmaci antipsicotici e clozapina sia molto studiata, non sono a oggi disponibili dati definitivi.

La somministrazione contemporanea di aripirazolo e clozapina non comporta significative variazioni plasmatiche di quest'ultima. Da uno studio del 2010, condotto su sette pazienti schizofrenici, sembra che si possa escludere l'influenza di aripirazolo sul metabolismo di clozapina (Benedetti et al., 2010). Lo stesso si può affermare per l'associazione tra clozapina e risperidone, aloperidolo e olanzapina: da diversi studi condotti sino a oggi non è emersa alcuna particolare interazione tra i diversi antipsicotici e clozapina (Honer et al., 2009; Nosè et al., 2009; Özlamete et al., 2010; Benedetti et al., 2010).

Farmaci inibitori della mitogenesi	Possibile azione sinergica sull'agranulocitosi
Carbamazepina	Possibile azione sinergica sull'agranulocitosi, anche se non dimostrata
Fluoxetina Fluvoxamina Paroxetina Sertralina	Elevazione plasmatica di clozapina (in particolare con fluvoxamina) dimostrata da alcuni studi
Antidepressivi triciclici Fenotiazine Altri farmaci metabolizzati dal CYP 450	Ridotta attività del CYP 450 nel 3-10% dei casi. Tendenza all'aumento dei valori plasmatici di clozapina
Benzodiazepine	Sommazione degli effetti sedativi
Antipertensivi	Sommazione degli effetti ipotensivi
Anticolinergici	Sommazione degli effetti anticolinergici
Anticonvulsivanti	Clozapina può abbassare la soglia anticonvulsivante con conseguente riduzione dell'efficacia dei trattamenti antiepilettici.

Tabella 4. *Interazioni farmacologiche di clozapina (Pancheri, 2007).*

FATTORI GENETICI

L'importanza del ruolo svolto dai fattori genetici nel determinare la variabilità interindividuale nella risposta ai farmaci è ormai ampiamente documentata.

Alla fine degli anni '80 appariva già chiaro che le differenze nella risposta alla somministrazione di un medesimo farmaco tra soggetti diversi erano nettamente maggiori rispetto alle differenze rilevate nello stesso soggetto in momenti diversi della terapia o in gemelli omozigoti (Vessel, 1989). Non erano però ancora chiari i meccanismi responsabili di tale variabilità. Nel decennio successivo, i diversi studi condotti in merito hanno consentito di ricondurre a fattori di ordine genetico più del 90% dei casi di diversa risposta clinica al trattamento (Kalow et al., 1998).

Da una metanalisi più recente è emerso che le concentrazioni plasmatiche di uno stesso farmaco, somministrato alla stessa dose e con le stesse modalità a due differenti soggetti di uguale peso e altezza, può subire variazioni pari anche a 600 volte (Eichelbaum et al., 2006). Da questa stessa metanalisi emerge che la principale causa di tale variabilità e della conseguente diversità nella risposta clinica sono i polimorfismi genetici dei sistemi enzimatici, responsabili del metabolismo di oltre il 30% dei farmaci.

Si può quindi affermare che, nonostante tutti i fattori in precedenza descritti mantengano un ruolo importante nell'influenzare la risposta clinica, esistono sempre maggiori evidenze di come i fattori genetici siano responsabili delle più importanti variazioni del “destino” farmacodinamico e farmacocinetico a cui sono sottoposti i farmaci all'interno dell'organismo (Evans e Relling, 1999; Evans e Johnson, 2001; Kitzmillet et al., 2011).

L'attenzione di questa tesi sarà rivolta in particolare ai fattori genetici in grado di influenzare i processi farmacocinetici, con specifica considerazione per la variabilità

dell'attività delle proteine trasportatrici e degli enzimi responsabili del metabolismo dei farmaci (DMEs- Drug Metabolizing Enzyme). Infatti, le differenze interindividuali nella struttura e nell'attività del citocromo P450 epatico e delle proteine trasportatrici sono le più studiate e meglio descritte, in quanto elemento determinante della diversa risposta clinica a un trattamento farmacologico.

Tali conoscenze sono il frutto del continuo sviluppo e della sempre maggiore rilevanza della “farmacogenetica”, scienza deputata allo studio dei suddetti fattori genetici e della loro correlazione con la risposta clinica.

IV. FARMACOGENETICA E VARIABILITÀ NELLA RISPOSTA ALLA CLOZAPINA

Nell'impostazione di una terapia farmacologica, un obiettivo tanto fondamentale quanto complesso da raggiungere è una “personalizzazione” del trattamento che consenta di selezionare, per ogni singolo paziente, i farmaci con il miglior rapporto rischio/beneficio. La farmacogenomica e la farmacogenetica danno un contributo fondamentale in merito.

La *farmacogenomica* viene definita dalla Food and Drug Administration (FDA) come “lo studio della correlazione tra le variazioni delle caratteristiche di DNA e RNA e la risposta al trattamento”. Questa branca della farmacologia utilizza le conoscenze acquisite dalla genetica, dalla biologia molecolare e dallo *Human Genome Project* per ottimizzare la scelta del farmaco e il suo dosaggio, suddividendo i pazienti in base al loro profilo genetico (Trent, 2010; Vijverberg et al., 2010).

La *farmacogenetica* è definita, sempre dalla FDA, come la “scienza che studia il legame tra la variazione delle sequenze del DNA e la risposta al trattamento farmacologico”. Il campo d'applicazione di questo settore della farmacologia, presente fin dagli anni '50, è, dunque, la “medicina personalizzata” (Trent, 2010).

Negli ultimi anni, la comunità scientifica ha investito e creduto molto nelle due discipline, con la speranza cambiare l'approccio terapeutico e passare da un modello empirico (definito anche “trial-and-error”) a uno centrato sul singolo paziente (Vijverberg et al., 2010; Pirmohamed, 2010; Vegenberg et al., 2010).

È stato stimato che solo il 50% dei pazienti risponde in modo positivo alla terapia assunta: questo potrebbe essere dovuto all'inadeguatezza del farmaco scelto e/o ai continui cambiamenti apportati alla terapia nel tentativo di raggiungere un buon equilibrio tra reazioni avverse ed efficacia clinica (Squassina et al., 2010). La tollerabilità di un farmaco e gli effetti avversi a esso correlati subiscono consistenti variazioni tra i diversi pazienti, anche a fronte di uno schema terapeutico identico per

tutti. Una possibile spiegazione a tale fenomeno risiede nel patrimonio genetico individuale; questo, infatti, può determinare modificazioni nella struttura, nell'espressione e nell'attività delle molecole coinvolte nel metabolismo dei farmaci, con possibile sviluppo di risposte abnormi, sia in termini farmacocinetici che farmacodinamici, tanto imprevedibili quanto potenzialmente gravi (Ventola, 2011).

Le conoscenze apprese dal rapido sviluppo di queste due discipline sono state applicate con successo anche in ambito psichiatrico, con particolare attenzione al ruolo svolto dai polimorfismi genetici nella variabilità della risposta ai farmaci antipsicotici.

Con il termine *polimorfismo genetico* si definisce un carattere monogenico presente nella popolazione in almeno due differenti fenotipi (e verosimilmente in almeno due genotipi), di cui il più raro con frequenza di almeno 1-2% (Daly et al., 1993). L'allele che conferisce il carattere di "funzionamento metabolico normale" è definito *wild type* (*wt*); gli alleli mutanti differiscono dall'allele *wt* a causa del sopraggiungere di una mutazione puntiforme, di una delezione o di una duplicazione. La variazione minima che può dar esito a un polimorfismo è la mutazione di una singola base del DNA: si parla in questo caso di *polimorfismi a singolo nucleotide* (*Single Nucleotide Polymorphisms* o *SNPs*). Gli SNPs rappresentano il 90% dei polimorfismi presenti nell'uomo. Essi rappresentano la variazione genetica più comune nell'essere umano (Kao et al., 2000).

I polimorfismi che intervengono a carico di enzimi implicati nel metabolismo di un farmaco, si traducono nella produzione di varianti enzimatiche con attività molto aumentata rispetto alla norma oppure, al contrario, estremamente ridotta o nulla; è quindi intuitivo quanto tutto questo possa influire sul raggiungimento dell'efficacia desiderata in un trattamento farmacologico.

Di seguito verranno descritti gli SNPs più importanti, suddivisi tra ambito farmacodinamico e farmacocinetico, per i quali è stata trovata una correlazione con la risposta ai farmaci antipsicotici e, in particolare, alla clozapina.

POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNPs) IN FARMACODINAMICA

Gli studi di farmacogenetica hanno focalizzato l'attenzione sui polimorfismi dei recettori dopaminergici D₂, D₃ e D₄ e dei recettori serotoninergici 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} e 5-HT₆, poiché ritenuti coinvolti nella variabilità della risposta clinica alla clozapina. Nonostante le conoscenze in merito siano ancora limitate, è stato evidenziato come la ridotta efficacia di un trattamento o l'elevata frequenza di effetti collaterali possano essere ascritti a variazioni dei geni che codificano per i suddetti recettori.

Polimorfismi dei recettori dopaminergici

Le vie di trasmissione ad attività dopaminergica rappresentano un elemento determinante nello sviluppo della schizofrenia: gli studi effettuati con tecniche di neuroimaging hanno, infatti, dimostrato una correlazione tra lo sviluppo di deficit cognitivi e una ridotta innervazione dopaminergica a livello della corteccia prefrontale dorsolaterale. Le ricerche in merito sono orientate alla valutazione del ruolo svolto dai polimorfismi dei diversi recettori dopaminergici nella variabilità della risposta alle terapie farmacologiche, compresa la clozapina.

Polimorfismi del recettore D₁. Uno studio condotto nel 2002 da Masellis et al. su 35 pazienti schizofrenici in terapia con clozapina ha dimostrato l'esistenza di una

correlazione tra la presenza del polimorfismo del recettore dopaminergico D₁ e la risposta al trattamento con l'antipsicotico in termini di miglioramento delle funzioni cognitive (valutazione funzionale effettuata tramite *Wisconsin Card Sort Test*). Potkin e colleghi hanno successivamente approfondito l'argomento: avvalendosi della tomografia a emissione di positroni (PET) hanno dimostrato un miglioramento della risposta alla *Brief Psychiatric Rating Scale* (BPRS) pari al 30% in pazienti con genotipo DRD1 2,2, mentre il genotipo DRD1 1,2 è risultato associato a un peggioramento del 7% dei valori della BPRS (Potkin et al., 2003).

Polimorfismi del recettore D₂. Esiste una potenziale associazione tra gli SNPs del recettore D₂ (in particolare -141C Ins/Del e TaqIA) e la risposta clinica alla clozapina. La validità dei risultati è, però, ridotta a causa della ristrettezza del campione e degli esiti tra loro contrastanti (Zhang et al., 2010). Vengono considerati di seguito i due principali SNPs a carico di DRD2: -141C Ins/Del e TaqIA.

- **141C Ins/Del.** Questo polimorfismo è determinato da una delezione della citosina in posizione -141, nella regione promotrice del gene DRD2. La sua frequenza varia dal 10% nella popolazione caucasica e giapponese al 50% nella popolazione africana (Zhang et al., 2010).

Nel 1998, Arranz e colleghi ipotizzavano una correlazione tra questo SNPs e la risposta alla terapia con clozapina. Le varianti alleliche soggette a studio erano *Ins/Ins*, *Ins/Del* e *Del/Del*. Tuttavia dopo aver confrontato 151 pazienti britannici schizofrenici in terapia con clozapina e 146 pazienti cinesi schizofrenici in terapia con altri antipsicotici, gli autori non riscontravano alcuna associazione significativa tra il polimorfismo in oggetto e la risposta alla clozapina. Questi risultati venivano confermati da un secondo studio, condotto

questa volta su 176 pazienti schizofrenici di etnia giapponese. (Ohara et al., 1998).

Malhotra e colleghi nel 1999, invece, in uno studio su 72 pazienti in terapia con clozapina, riscontravano un decremento della sintomatologia 5 volte superiore nei soggetti non portatori della delezione dell'allele (141C Ins/Ins) rispetto ai soggetti portatori della delezione (-141C Ins/Del o -141C Del/Del).

Sono a tutt'oggi in corso diversi studi orientati a chiarire l'effettivo ruolo svolto da questo polimorfismo nella risposta ai farmaci antipsicotici.

- **Taq IA.** Questo SNPs comporta la sostituzione di una citosina con una timina, localizzata 10 kb a valle del gene DRD2. Gli studi condotti su questo polimorfismo hanno preso in considerazione le seguenti varianti alleliche: A1/A1, A1/A2, A2/A2 . Un lavoro condotto su 25 pazienti giapponesi, trattati per almeno 3 settimane con nemonapride, ha rivelato una potenziale associazione tra la presenza dell'allele A1 (A1/A1 o A1/A2) e una riduzione nella sintomatologia positiva della psicosi. Nessun miglioramento è emerso, invece, in merito alla sintomatologia negativa e ai deficit cognitivi (Suzuki et al., 2000).

È stata riscontrata, inoltre, la potenziale correlazione di questo SNPs e il miglioramento clinico durante somministrazione di aloperidolo. Tra 57 pazienti schizofrenici trattati con aloperidolo per almeno 28 giorni, i soggetti eterozigoti hanno mostrato un più marcato miglioramento della sintomatologia positiva rispetto ai soggetti omozigoti. Questa correlazione non si è mostrata valida per i sintomi negativi (Schäfer et al., 2001).

Nonostante i numerosi studi abbiano fornito risultati incoraggianti, non è possibile ancora definire con certezza l'entità della correlazione esistente tra polimorfismi del recettore dopaminergico D₂ e risposta clinica alla terapia con farmaci antipsicotici.

Polimorfismi del recettore D₃. Il polimorfismo a carico del gene DRD3 consiste nella sostituzione di una serina con una glicina in posizione 9 nell'esone 1. Il recettore affetto da mutazione sembra avere una elevata affinità per i ligandi D₃ selettivi e per dopamina, ma non per i ligandi D₂ selettivi (Lundstrom e Turpin, 1996); inoltre, la variante Gly9 pare aumentare la densità di DRD3 in alcune aree cerebrali (Jeanneteau et al., 2006).

Tra il 1990 e il 2010 sono stati condotti almeno 18 studi (la maggior parte dei quali basati sulla somministrazione di clozapina) con l'obiettivo di definire la correlazione tra il SNP Ser9Gly e la risposta agli antipsicotici. Da una recente review di questi lavori (Zhang, 2011), sono emerse le seguenti osservazioni:

- l'espressione dell'allele Ser è associata a una migliore risposta agli antipsicotici tipici, ma è correlata a una scarsa risposta alla clozapina;
- la correlazione tra frequenza di espressione dell'allele Ser o del genotipo Ser/Ser e risposta alla clozapina è risultata statisticamente non significativa (Hwang et al., 2010);
- gli studi più recenti non hanno mostrato un legame significativo tra l'espressione del polimorfismo Ser9Gly e la risposta agli antipsicotici di seconda generazione (in particolare risperidone e aripiprazolo).

Seppure l'ipotesi del coinvolgimento del gene DRD3 nella variabilità della risposta agli antipsicotici continui a essere oggetto di interesse scientifico, nessuno studio sperimentale ha ancora prodotto risultati determinanti (Zhang, 2011).

Polimorfismi del recettore D₄. Il gene DRD4 codifica per il recettore dopaminergico D₄ ed è localizzato sul cromosoma 11p15.5. La sua sequenza genica è altamente polimorfica e il SNP più studiato è rappresentato da un tratto di 48 coppie di basi (48-bp), ripetute in numero variabile da 2 a 10 volte.

Diversi autori, sin dai primi anni '90, hanno cercato di dimostrare una correlazione tra il numero di ripetizioni di 48-bp e la risposta agli antipsicotici, in particolare clozapina. Nonostante uno studio su 80 pazienti di origine cinese abbia dimostrato una correlazione tra la ripetizione di 4 o 7 volte di 48-bp e una più marcata risposta alla terapia (Hwu et al., 1998), nessuno degli studi successivi è stato in grado di avvalorare concretamente questi risultati.

Polimorfismi dei recettori serotoninergici

Il sistema di trasmissione serotoninergico è ampiamente studiato: esso, infatti, svolge un ruolo fondamentale non solo nell'espressione di disturbi di personalità e disturbi da stress (Moresco, 2002), ma anche nella regolazione dell'asse ipotalamo-ipofisario (Dinan, 1996; Zhang et al., 2002). In particolare, diversi studi hanno dimostrato che la deplezione di serotonina si correla con l'aumento dell'attività dell'asse ipotalamo-ipofisario (Pruessner et al., 2004; Hood et al., 2006) e con l'espressione di alcuni comportamenti patologici, come scarso controllo degli impulsi e aumentata ostilità (Cleare e Bond, 1997; Manuck et al., 1998; Flory et al., 2004; Hennig et al., 2005).

Dal punto di vista farmacologico, i recettori serotoninergici rappresentano un target per diversi farmaci antipsicotici, soprattutto quelli di seconda generazione. Lo studio dei loro polimorfismi può, dunque, risultare utile per migliorare le terapie farmacologiche in ambito psichiatrico.

Polimorfismi del recettore 5HT_{2A}. Il gene HTR2A, che codifica per il recettore 5HT_{2A}, è localizzato sul cromosoma 13q14-q21 ed è altamente polimorfico. Tra tutti gli SNPs, quelli più studiati sono T102C, A-1438G e His452Tyr.

- **T102C e A-1438G.** T102C è un polimorfismo che non si associa ad alcuna sostituzione aminoacidica ed è in linkage disequilibrium con un secondo polimorfismo (A-1438G), localizzato nella regione promotrice del gene HTR2A (Arranz et al., 1998). Sono stati pubblicati numerosi studi in merito all'associazione tra il SNP T102C e la risposta ai farmaci antipsicotici. I primi studi erano focalizzati solo sulla clozapina, mentre i più recenti hanno analizzato anche la risposta a risperidone, olanzapina e aripiprazolo. Nel 1998 Arranz e colleghi, da una revisione dei risultati di sei studi sino ad allora condotti su un totale di 733 pazienti, riscontravano una correlazione tra l'espressione dell'allele C del SNP e una ridotta risposta alla clozapina. Successivamente, altri due studi hanno esaminato la variabilità nella risposta alla clozapina, ma nessuno dei due ha confermato l'associazione riportata negli anni precedenti (Masellis et al., 1998; Lin et al., 1999). Più recentemente, invece, due studi volti a valutare la risposta al risperidone hanno identificato un più netto miglioramento della sintomatologia negativa in pazienti portatori del genotipo C/C; questo risultato è in contrapposizione con quanto riscontrato dai primi studi condotti sulla clozapina (Lane et al., 2002; Kim et al., 2008).

Anche dalle valutazioni condotte sul SNP A-1438G derivano risultati tra loro contrastanti. Tre studi hanno registrato una correlazione tra il genotipo G/G e una ridotta risposta a clozapina, olanzapina ed aripiprazolo, in particolare per quanto riguarda la sintomatologia negativa (Arranz et al., 1998; Ellingrod et al., 2003; Chen et al., 2009). Benmessaoud e colleghi, invece, in un lavoro del 2008

su 100 pazienti algerini, hanno riscontrato una correlazione tra l'espressione dell'allele G e una risposta migliore alla somministrazione di aloperidolo.

- **His452Tyr.** Si tratta di un polimorfismo localizzato sull'esone 3 che porta alla sostituzione di una istidina con una tirosina in posizione 452. Da analisi *in vitro* emerge come la sostituzione aminoacidica sia associata a una ridotta affinità di legame per i farmaci antipsicotici. I risultati di tre studi clinici mostrano come l'espressione dell'allele Tyr comporti una ridotta risposta alla somministrazione di clozapina, rispetto all'allele His (Arranz et al., 1996; Masellis et al., 1998; Arranz et al., 1998). Questi risultati non trovano, però, un accordo in altre ricerche (Malhotra et al., 1996; Ellingrod et al., 2002).

Polimorfismi del recettore 5HT_{2C}. Il gene HTR2C, che codifica per il recettore 2C della serotonina, è localizzato sul cromosoma Xq24. Numerosi SNPs che intervengono a suo carico sono stati correlati con la variabilità della risposta ai farmaci antipsicotici, ma il più importante sembra essere il Cys23Ser (Zhang e Malhotra, 2011). Questo SNP comporta la sostituzione di una cisteina con una serina nella sequenza aminoacidica. Nonostante la modificazione nella struttura del recettore, non sembra esserci alcun cambiamento nella sua funzione. Soltanto il primo studio clinico ha riscontrato una migliore risposta alla clozapina nei pazienti portatori dell'allele Ser, rispetto agli omozigoti Cys/Cys (Yu et al., 1999). Questo risultato non è più stato confermato dagli studi successivi.

Polimorfismi del recettore 5HT₆. Questo recettore è codificato dal gene HTR6 localizzato sul cromosoma 1p36. Un SNP a suo carico, il C267T, è stato valutato in quattro differenti studi. Due studi hanno individuato una correlazione significativa tra

genotipo T/T e migliore risposta alla terapia con clozapina (Yu et al., 1999; Lane et al., 2004). In entrambi i lavori, il campione era formato da soggetti di origine cinese. Due ulteriori studi, invece, effettuati su soggetti caucasici e giapponesi, non hanno fornito risultati significativi in merito (Masellis et al., 2001; Ikeda et al., 2008).

Ad oggi non è comunque possibile definire con certezza se il SNP C267T sia un marcatore specifico per la risposta alla clozapina in soggetti cinesi.

POLIMORFISMI A SINGOLO NUCLEOTIDE (SNPs) IN FARMACOCINETICA

Nel campo della farmacocinetica, l'attenzione dei ricercatori è orientata principalmente ai polimorfismi a carico del sistema delle proteine trasportatrici e del sistema enzimatico del citocromo P450. Infatti, dai dati disponibili in letteratura, si evince chiaramente quanto sia determinante l'influenza esercitata da tali variazioni genetiche nella variabilità della risposta alla terapia farmacologica.

Si descriveranno di seguito i principali polimorfismi di interesse farmacocinetico, con particolare attenzione a quelli relativi al sistema enzimatico del CYP450 1A2 e ai polimorfismi del sistema delle proteine trasportatrici, che occupano un posto centrale in questo studio.

Polimorfismi del sistema delle proteine trasportatrici

Nel 1998, anno in cui per la prima volta Mickley et al. hanno riportato l'esistenza di due polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) a carico del gene ABCB1 che codifica per la proteina trasportatrice glicoproteina P (PGP): uno nell'esone 21 (2677_{G>T}) e uno nell'esone 24 (2995_{G>A}). Da allora sono stati riconosciuti numerosi altri SNPs e molti di questi si sono rivelati in grado di influenzare significativamente l'espressione e/o

L'attività di trasporto del prodotto genico, la Glicoproteina P o PGP (Ieiri, 2012). È necessario precisare che all'interno della popolazione caucasica la frequenza di queste varianti alleliche resta, nella maggior parte dei casi, bassa (<8%). Fanno eccezione tre di questi SNPs, uno sull'esone 12 (1236_{C>T}), uno sull'esone 26 (3435_{C>T}) e uno sull'esone 21 (2677_{G>T/A}), che sono in linkage disequilibrium con frequenza allelica del 45-55% (Pauli – Magnus et al., 2004; Dulucq et al., 2009). Dal punto di vista strutturale, gli SNPs 1236_{C>T} e 3435_{C>T} non comportano alcuna modificazione nella sequenza aminoacidica della proteina, pur essendo associati a una riduzione dell'espressione del mRNA. Lo SNP 2677_{G>T/A} è invece responsabile della sostituzione in posizione 893 di una alanina con una serina o una treonina ed è in grado di determinare la riduzione dell'attività del trasportatore (Fung et al., 2009).

L'espressione della Glicoproteina-P nei diversi tessuti mostra significative differenze interindividuali. Da uno studio condotto da Hoffmeyer et al. nel 2000, si evince che lo SNP 3435_{C>T} si correla con un'importante riduzione dell'espressione di PGP a livello intestinale in individui omozigoti T/T in confronto a individui omozigoti per l'allele C (C/C), con conseguente aumento della concentrazione plasmatica di alcuni farmaci.

Nel 2009 Consoli e colleghi hanno condotto uno studio in merito a una possibile associazione tra i polimorfismi a carico del gene ABCB1 e la variabilità dei livelli plasmatici di clozapina. Tale indagine ha previsto il reclutamento, a distanza di un mese dall'inizio della terapia con clozapina, di un campione costituito da 40 uomini (età 47.6 +/- 16.6, mediana: 42 anni) e 20 donne (età 40.7 +/- 11.4, mediana: 38 anni) e la determinazione tramite PCR dei tre principali polimorfismi di ABCB1: il SNP 1236_{C>T} (esone 12), il 2677_{G>T} (esone 21) e il 3435_{C>T} (esone 26). La concentrazione plasmatica di clozapina è stata determinata tramite la tecnica HPLC. Risultati particolarmente interessanti sono emersi dalla valutazione del SNP 3435_{C>T}: i 15 pazienti omozigoti

per l'allele C (C/C) hanno richiesto, per ottenere lo stesso beneficio clinico, dosi giornaliere di clozapina più elevate rispetto ai pazienti eterozigoti C/T e a quelli omozigoti T/T. In conclusione, gli autori ritengono che per pazienti con SNP 3435CC si debba prendere in considerazione la somministrazione di dosaggi di clozapina più elevati. Sempre nel 2009 Jacquenod S. et al. hanno effettuato uno studio su un campione di 75 pazienti in terapia con clozapina, orientando l'attenzione sul ruolo che i polimorfismi di ABCB1 e di CYP450 svolgono nell'influenzare il profilo farmacocinetico dell'antipsicotico in studio. È stato così possibile evidenziare una forte correlazione tra la presenza del SNP 3435_{C>T} e i livelli plasmatici di clozapina: in particolare, i pazienti omozigoti per l'allele T (T/T) hanno mostrato livelli plasmatici di clozapina maggiori rispetto agli altri pazienti.

Da questi studi, i cui risultati sono stati confermati in recenti lavori di metanalisi (Moons T. et al, 2011; Karlsson, 2012), risulta chiara l'importanza dello studio del ruolo dei polimorfismi dei geni che codificano per le proteine di trasporto nel determinare la variabilità interindividuale della risposta alla clozapina. La genotipizzazione dei polimorfismi di ABCB1 potrebbe essere considerata come un utile strumento aggiuntivo, al fine di ottimizzare e personalizzare la terapia con farmaci poco maneggevoli come la clozapina.

In merito alla BCRP, in letteratura sono riportati numerosi studi che riguardano ai polimorfismi del gene ABCG2 che la codifica. Tra tutti quelli individuati finora (circa 80), il SNP C421A, risultante nella sostituzione di una glutammina con una lisina nel prodotto genico finale, è quello che ha riscosso maggiore interesse. La frequenza di questo SNP è piuttosto elevata nelle popolazioni Giapponese e Cinese (35%) meno nella popolazione Afro-americana (2-5%), Ispanica (10%) Europea (11-14%) e Asiatica (13%) (Lepper et al., 2005). Diversi studi hanno individuato che il polimorfismo C421A

si correla con una ridotta espressione e attività della BCRP rispetto alla popolazione con genotipo *wild type* (Imai et al., 2002; Mizuarai et al., 2004; Tamura et al., 2007). Tuttavia, alcuni autori sono giunti a conclusioni diverse. In uno studio condotto su 36 pazienti trattati con nitrofurantoina, tutti genotipizzati e classificati come portatori del SNP C421A, la correlazione tra polimorfismo e ridotta espressione della proteina non è risultata così solida. Gli autori hanno ipotizzato che la variazione dell'attività della BCRP dipenda, oltre che dal genotipo, anche dal substrato utilizzato per la valutazione (Kimberly et al., 2008).

Nonostante la scarsità di informazioni e le incongruenze tra i risultati, appare comunque chiara l'importanza del ruolo svolto dalla BCRP e dai suoi polimorfismi nel determinare la variabilità nella risposta ai farmaci; sono pertanto necessari ulteriori studi di approfondimento in merito.

Lo studio di BCRP e del suo SNP C421A occupa un posto importante all'interno di questo studio, per le già citate interazioni tra la proteina e i farmaci antipsicotici, in particolare clozapina.

Polimorfismi del sistema enzimatico del citocromo P450

Come già discusso nel precedente capitolo, il sistema enzimatico del citocromo P450 rappresenta un elemento fondamentale nella biotrasformazione di numerosi farmaci, compresa la clozapina. Numerosi studi hanno analizzato le diverse isoforme enzimatiche, ponendo particolare attenzione all'individuazione dei polimorfismi in grado di modificarne l'attività e di influire, quindi, sulla biodisponibilità dei substrati enzimatici. Tra le diverse isoforme enzimatiche, il CYP1A2 e il CYP2D6 sembrano mostrare una maggiore correlazione con la variabilità nella risposta clinica alla clozapina; per questo motivo, di seguito verranno considerate le attuali conoscenze in

merito alle due isoforme e ai relativi SNPs, con particolare attenzione al citocromo P1A2.

Citocromo P1A2. Il gene codificante per questa isoforma enzimatica è localizzato sul cromosoma 5 e contiene 6 esoni. Il metabolismo della clozapina dipende per circa il 70% dal CYP1A2 (Berlisson et al., 1994; Özdemir et al., 2001).

In letteratura sono numerose le testimonianze di come la variabilità interindividuale dell'attività del citocromo sia legata anche a fattori genetici (Klein et al., 2010). In particolare, alcuni autori hanno rivolto l'attenzione al ruolo dei polimorfismi del gene CYP1A2, constatando la presenza di una correlazione tra le variazioni genetiche e la risposta clinica alla clozapina, sia in termini di efficacia che di comparsa di effetti collaterali (Murray et al., 2006).

A oggi sono stati individuati 16 alleli e più di 30 SNPs nelle regioni codificanti e non codificanti del gene del CYP1A2 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp1a2.htm>). Fra questi, due in particolare possiedono una frequenza allelica superiore a 1-2% nella popolazione caucasica e potrebbero essere importanti nella valutazione funzionale del citocromo P1A2 (Fuhr et al., 1994; Wang e Zhou, 1999; Zhou, 2010):

- **CYP1A2*1C.** La frequenza allelica è del 5-20% nella popolazione caucasica (Todesco, 2003). Consiste in una mutazione puntiforme che comporta la sostituzione in posizione -3860 di una guanina con una adenina (-3860G>A). La conseguenza funzionale è una ridotta inducibilità rispetto all'allele *wild type* (CYP1A2*1), e un decremento dell'attività metabolica. Ciò potrebbe condurre a una ridotta biotrasformazione di clozapina, con possibile accumulo di farmaco in circolo e aumentato rischio di reazioni avverse.

- **CYP1A2*1F.** La frequenza allelica nella popolazione caucasica è del 68% (Todesco et al., 2003). La mutazione puntiforme consiste nella sostituzione di una citosina con una adenina in posizione -163 (-163C>A). L'esito è una aumentata inducibilità enzimatica, soprattutto nei soggetti fumatori (Eap et al., 2004; Klein et al., 2010).

In un recente lavoro, 100 pazienti, di età compresa tra 19 e 60 anni affetti da schizofrenia cronica in terapia con clozapina, sono stati reclutati al fine di valutare la correlazione tra CYP1A2*1F e la risposta clinica alla clozapina. Al termine dello studio è risultato che il genotipo 1*F/1*F è associato a una più scarsa risposta clinica alla clozapina rispetto ai soggetti portatori di almeno un allele *wt* (*1/*1 o *1/*1F), in particolare nei fumatori (Balibey et al., 2011).

Già nel 1999, Sachse e colleghi avevano sottolineato come il genotipo *1F/*1F si correli con un incremento della attività del CYP1A2 pari al 60-70% rispetto ai genotipi *1/*1F e *1/*1. In un caso clinico riportato da Özdemir e colleghi nel 2001, il genotipo *1F/*1F è risultato associato a una maggiore resistenza al trattamento con clozapina.

In conclusione l'allele CYP1A2 *1C è associato a una diminuita attività metabolica e l'allele CYP1A2 *1F a una aumentata induzione enzimatica, particolarmente nei fumatori (Eap et al., 2004). Tali polimorfismi rendono conto di una percentuale significativa delle mancate risposte al trattamento, o della comparsa di reazioni avverse. Soggetti “scarsamente metabolizzanti” per un determinato isoenzima potrebbero presentare concentrazioni plasmatiche più elevate del farmaco da esso metabolizzato e incorrere più facilmente in reazioni avverse ed effetti collaterali, anche a dosaggi considerati normalmente terapeutici. Viceversa, soggetti “altamente metabolizzanti” potrebbero mostrare una risposta insoddisfacente (Eap, 2004).

È già stato condotto uno *studio retrospettivo*, il cui obiettivo era quello di approfondire la relazione tra *reazioni avverse* (ADRs) indotte da CLZ in pazienti schizofrenici, tali da determinare la sospensione della terapia o la riduzione della posologia, e i polimorfismi del CYP1A2 in grado di influenzare il metabolismo di questo antipsicotico. Tale studio ha permesso di formulare le seguenti conclusioni:

1. esiste una correlazione tra l'aplotipo del CYP1A2 (formato dai due polimorfismi *F e *C entrambi nella regione promotrice del gene) e il rischio di ADRs da CLZ, ma non tra i polimorfismi *F e *C considerati singolarmente e il rischio di ADRs;
2. l'aplotipo è correlato ai livelli di espressione di mRNA (estratto dai linfociti circolanti);
3. i livelli di mRNA sono correlati alla comparsa di ADRs da CLZ (Bortolaso et al., 2009).

Citocromo P2D6. L'enzima è codificato dal gene localizzato sul cromosoma 22q13.1. I polimorfismi a carico di questo gene comprendono SNPs, delezioni e inserzioni di frammenti di DNA. In particolare, quattro polimorfismi (*3, *4, *5 e *6) e i fenotipi che ne derivano sono responsabili dell'espressione di diversi gradi di attività enzimatica in base ai quali i soggetti sono considerati: “scarsi metabolizzatori” (PM), “metabolizzatori intermedi” (IM), “metabolizzatori estesi” (EM) e “metabolizzatori ultrarapidi” (UM). I soggetti classificati come EM possiedono attività enzimatica normale, mentre i PM e IM hanno rispettivamente attività enzimatica assente o estremamente ridotta. I soggetto UM, invece, hanno attività enzimatica molto aumentata. Approssimativamente il 7-10% dei soggetti caucasici e il 1-2% dei soggetti asiatici rientra nella classe dei PM (Arranz et al., 2007) e mostrano quindi la tendenza all'accumulo plasmatico dei farmaci assunti.

I soggetti metabolizzatori ultrarapidi, invece, sono presenti con frequenza <1% e tendono a mostrare livelli plasmatici di farmaco molto ridotti. A livello teorico, i soggetti PM e IM richiedono, per ottenere la stessa risposta clinica, dosi maggiori di farmaco rispetto ai soggetti UM. Comunque i dati a conferma di questa ipotesi sono ancora insufficienti e gli studi condotti a questo proposito non hanno portato a risultati definitivi.

Due studi hanno indagato la correlazione tra polimorfismi del CYP2D6 e i livelli plasmatici di risperidone. Da entrambi risulta che soggetti PM e IM presentano concentrazioni plasmatiche di farmaco superiori rispetto a soggetti EM e UM, ma in nessun caso il genotipo e i livelli plasmatici sono risultati utili nel predire la risposta clinica (Riedel et al., 2005; Kakihara et al., 2005).

In conclusione, nonostante siano interessanti dal punto di vista teorico le conoscenze attualmente disponibili in merito ai polimorfismi del CYP2D6 non possono essere utilizzate come strumento di valutazione e previsione della risposta clinica, poiché mancanti di conferme scientificamente provate.

V. STUDIO SPERIMENTALE

OBIETTIVI

L'obiettivo dello studio è valutare il ruolo delle differenze genetiche sia nel principale enzima responsabile della metabolizzazione (CYP1A2) che del trasporto (ABCB1 e ABCG2) della CLZ nel determinare variazioni della risposta clinica al trattamento con CLZ. Ciò al fine di suggerire delle linee guida utilizzabili per l'uso sicuro ed efficace di questo farmaco. Il lavoro si inquadra all'interno del filone di ricerca di Farmacogenetica del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale - Sezione di Farmacologia - Università degli Studi dell'Insubria.

L'approccio scelto per raggiungere questo obiettivo consiste nell'integrazione dei risultati ottenuti dai "test" di laboratorio (determinazione del profilo genetico) con il counseling sia del farmacologo (es. valutazione delle interazioni tra farmaci, della funzionalità degli organi emuntori, abitudine al fumo di sigaretta) che dello psichiatra (es. valutazione del grado e della durata della malattia).

Definire, nella maniera più dettagliata possibile, l'esistenza di un legame tra la presenza di polimorfismi e la variazione della risposta clinica, può essere certamente di ausilio nel migliorare le linee guida per l'utilizzo clinico di un farmaco come la clozapina tanto efficace quanto poco maneggevole. Individuare preventivamente i soggetti che, anche a fronte di dosaggi elevati, non presenterebbero comunque una risposta soddisfacente al trattamento, consentirebbe al clinico di tralasciare la somministrazione di clozapina, ancor prima di iniziare il trattamento e ricorrere a un diverso farmaco antipsicotico. I vantaggi sarebbero molteplici: evitare di esporre il paziente al rischio di reazioni avverse, anche gravi, ridurre il ritardo nell'impostazione di una terapia corretta ed efficace, facilitare lo sviluppo di una maggiore compliance da parte del paziente.

Infine, i risultati ottenuti tramite questo studio potrebbero rappresentare un efficace metodo di valutazione dell'impatto della terapia con clozapina; infatti, dopo aver

individuato i soggetti con insoddisfacente risposta clinica alla terapia e previo confronto fra clinico e farmacologo, sarebbe possibile attuare le necessarie modifiche alla posologia del farmaco sulla base dei riscontri clinico-anamnestici, genetici e laboratoristici.

MATERIALI E METODI

Disegno dello studio

Lo studio descritto in questa tesi è condotto nell'ambito del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale dell'Università degli Studi dell'Insubria.

Si tratta di uno studio prospettico di ricerca della durata di 3 anni durante il quale vengono reclutati pazienti che iniziano una terapia con clozapina. Lo studio prevede che i pazienti vengano trattati seguendo la normale pratica clinica e venga effettuata la correlazione tra profilo genetico dei pazienti e risposta clinica al farmaco misurata attraverso la somministrazione di *rating scale*.

I soggetti reclutati sono tutti utenti del DSM (Dipartimento di Salute Mentale) di Varese, afferenti alle strutture ambulatoriali, residenziali e ospedaliere della UOP II di Varese e della UOP I del Verbano.

Reclutamento dei pazienti

Per ogni paziente ritenuto idoneo è stato effettuato un colloquio iniziale con le seguenti finalità:

- acquisizione del consenso informato;
- raccolta dei dati socio-demografici;
- raccolta dell'anamnesi familiare;

- raccolta dell'anamnesi medica personale: anamnesi fisiologica, anamnesi patologica remota, anamnesi patologica prossima;
- anamnesi farmacologica: è stata registrata la presenza di eventuali terapie internistiche in atto e l'assunzione di terapia psicofarmacologica in precedenza e/o contemporaneamente al trattamento con clozapina. Particolare attenzione è stata rivolta all'assunzione di altri xenobiotici in grado di interferire con l'attività enzimatica del CYP450, soprattutto il fumo di sigaretta e l'assunzione di sostanze alcoliche e/o stupefacenti.
- valutazione clinica e psicopatologica, ottenuta tramite il colloquio e la somministrazione di scale di valutazione (*GAF- Global Assesmen of Functioning*; *PANSS- Positive and Negative Syndrome Scale*);

Nella stessa sede, per la determinazione del profilo genetico del soggetto, è stato effettuato un prelievo ematico (3 ml di sangue intero in EDTA).

A distanza di tre mesi, ha avuto luogo un secondo colloquio finalizzato a:

- valutazione clinica, anche questa volta supportata dalla somministrazione delle scale di valutazione;
- valutazione della compliance alla terapia;
- anamnesi recente: farmacologica, risorse impiegate, numero di visite, eventuali ricoveri, ritiro del soggetto dallo studio (drop-out).
- intervista specificamente orientata alla rilevazione di eventuali effetti collaterali riconducibili al trattamento con clozapina (*LUNTERS- Liverpool University Neuroleptic Side-Effects Rating Scale*).

Criteri di inclusione ed esclusione

I pazienti sono stati ritenuti idonei per l'arruolamento in questo studio se in possesso delle seguenti caratteristiche:

- maggiore età;
- diagnosi di Schizofrenia o di altro Disturbo Psicotico in base al DSM IV-TR (APA, 2002);
- presenza di indicazione al trattamento con clozapina;
- funzionalità epatica e renale nella norma;
- assenza di patologie organiche concomitanti;
- presenza della capacità di fornire autonomamente il consenso informato;

Il criterio di esclusione è invece la presenza di concomitante terapia farmacologica in grado di indurre o inibire l'attività del CYP1A2 (eccetto l'abitudine al fumo di sigaretta), della PGP o della BCRP.

Valutazione della risposta clinica al trattamento

Uno degli strumenti più utilizzati in ambito di ricerca, epidemiologia, clinica e psicofarmacologia è costituito dalle scale di valutazione (*rating scale*). Come affermato da Piccinelli e colleghi, l'utilizzo di questo strumento risulta indispensabile per:

- effettuare valutazioni standardizzate e ripetibili;
- monitorare, nella pratica clinica, lo stato psicopatologico del paziente;
- verificare l'efficacia e la tollerabilità del trattamento farmacologico.

In questo studio sono state utilizzate due differenti scale, al fine di poter effettuare una valutazione psicopatologica che considerasse il paziente nella sua globalità: *PANSS-Positive and Negative Syndrome Scale* e *GAF-Global Assessment of Functioning*. La PANSS è una scala messa a punto nel 1987 da Kay e colleghi e si compone di trenta

items così suddivisi: sette per i sintomi positivi, sette per i sintomi negativi e sedici per gli aspetti di psicopatologia generale. Per ciascun item il punteggio assegnato ha un valore compreso tra 0 e 7 (Kay et al., 1987).

Secondo uno studio pubblicato nel 2005, può essere considerato indice di risposta positiva al trattamento soltanto un decremento del punteggio di almeno il 50% rispetto ai valori registrati a inizio terapia. Tuttavia, se si considerano pazienti con psicopatologia definita come “resistente al trattamento”, il cut-off considerato indicativo è pari al 25%, poiché in tali soggetti anche solo un piccolo miglioramento sul piano psicopatologico può assumere un valore significativo (Leucht et al., 2005).

La GAF è una scala di etero valutazione che figura anche all'interno del DSM IV-TR (APA, 2002) come quinto asse del sistema di classificazione multiassiale. Consente di valutare il soggetto in merito al suo funzionamento psicologico, sociale e lavorativo sulla base di un ipotetico *continuum* salute-malattia mentale. La scala si articola in dieci livelli, ciascuno dei quali prevede un range di 10 punti, per un punteggio totale compreso tra 1 (funzionamento gravemente compromesso con elevato rischio di morte) e 100 (funzionamento superiore in un ampio spettro di attività).

Il miglioramento clinico del paziente, valutato mediante osservazione durante il periodo di trattamento, è considerato significativo a fronte di un incremento del punteggio della GAF pari o superiore a 20 punti (Szekeres et al., 2004).

Raccolta dei campioni biologici ed estrazione del DNA

Per ogni paziente sono stati prelevati 3 ml di sangue intero in EDTA. I prelievi sono stati eseguiti da personale infermieristico abilitato presso i CPS ed i CD per i pazienti che usufruiscono dei servizi ambulatoriali e presso le Comunità per i pazienti ivi

residenti. I campioni ottenuti sono stati recapitati, conservati e analizzati presso il Centro di Ricerca in Farmacologia Medica dell'Università degli Studi dell'Insubria.

L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata presso questa stessa sede utilizzando una metodica standard di estrazione su colonna (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada).

Al termine del processo di estrazione, i campioni sono stati quantificati tramite analisi spettrofotometrica a una lunghezza d'onda di 260 nm e conservati in seguito a una temperatura di -80°C, fino al momento dell'analisi genetica.

La conservazione dei dati clinici e del materiale biologico inerente lo studio è stata effettuata seguendo le raccomandazioni del garante per la protezione dei dati personali pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale n. 65 del 19 marzo 2007.

Genotipizzazione - Analisi dei polimorfismi

L'identificazione degli SNPs del citocromo CYP1A2 (CYP1A2 *C e CYP1A2 *F) e delle proteine di trasporto ABCB1 (ABCB1 1236C>T, ABCB1 3435C>T) e ABCG2 (ABCG2 421C>A) (**Tabella 5**) viene effettuata a partire da 100 ng di DNA mediante Real-Time PCR, utilizzando sonde TaqMan (Applied by Biosystems, Foster City, California, USA).

La tecnica consiste nella creazione di due sonde, marcate con due differenti fluorocromi, ciascuna delle quali in grado di riconoscere una forma allelica. Gli aplotipi formati dagli SNPs considerati in questo studio, sia a livello dei geni coinvolti nel trasporto della clozapina che del CYP1A2, sono stati identificati utilizzando il software SNPstats (Sinnwell e Schaid, 2005).

Gene	Forma allelica	Frequenza allelica (%)	Effetto fenotipico
CYP 1A2	*C (-3860 _{G>A})	5-10	Riduzione dell'attività
	*F (-163 _{C>A})	40	Aumento dell'inducibilità
ABCB1	136 C > T	38/46	Riduzione dell'espressione genica
	3435 C > T	52	Riduzione dell'espressione genica
ABCG2	421 G > A	12	Riduzione della capacità di trasporto

Tabella 5. Polimorfismi analizzati nello studio.

Analisi statistica

La correlazione tra la risposta al trattamento con clozapina e la presenza dei polimorfismi della ABCB1, della ABCG2 e del CYP1A2 è calcolata mediante test del χ^2 , o con test di Fisher con intervallo di confidenza del 95%. È stato inoltre calcolato l'odds ratio con un intervallo di confidenza del 95%. Sono considerati statisticamente significativi valori di $p < 0,05$. La relazione tra polimorfismi e risposta alla terapia è stata valutata utilizzando un modello con categorie e tre gruppi (modello co-dominante), sono stati utilizzati anche altri modelli (dominante e recessivo – dati non mostrati). L'analisi degli aplotipi è stata compiuta utilizzando un software disponibile on-line (SNPstats) seguendo le indicazioni riportate in letteratura (Sole et al, 2006). Per l'analisi statistica dei dati ci si avvale del software GraphPad.

RISULTATI

Descrizione del campione

Lo studio è stato eseguito sulla popolazione afferente presso i servizi psichiatrici della UOP I dell'Ospedale di Cittiglio (VA) e della UOP II dell'Ospedale di Circolo e Fondazione Macchi di Varese. I soggetti afferiscono alle strutture residenziali e ambulatoriali delle due UOP (Centri Psicosociali, Servizio Psichiatrico di Diagnosi e Cura, Centri Diurni, Comunità Riabilitativa a Media Assistenza).

Sono stati arruolati 46 pazienti (29 maschi e 17 femmine) con età media di 39,7 anni ($M=38,97$ e $F=40,95$). Per quanto riguarda la diagnosi, formulata sulla base dei criteri DSM-IV-TR, 31 pazienti sono affetti da Schizofrenia tipo paranoide [295.30], 3 pazienti hanno ricevuto diagnosi di Schizofrenia tipo disorganizzata [295.10], 5 pazienti di Disturbo psicotico non altrimenti specificato [298.9], 5 pazienti di Disturbo schizoaffettivo [295.70], 2 pazienti di Disturbo schizofreniforme [295.40].

Inoltre 35 pazienti risultano fare uso sporadico di alcolici e 26 pazienti hanno l'abitudine al fumo di sigaretta.

Le caratteristiche cliniche della popolazione arruolata sono riassunte in **Tabella 6**.

	sezzo	età	diagnosi DSM IV	esordio malattia	abitudine al fumo (SI/NO) n. di sigarette	consumo di alcool (SI/NO) quantità in ml
Pz01	M	46	Schizofrenia paranoide	1981	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz02	F	29	Psicosi NAS	2006	SI, 12/die	Uso sporadico
Pz03	M	48	Schizofrenia paranoide	1980	SI, 40/die	Uso sporadico
Pz04	F	49	Schizofrenia disorganizzata	1983	NO	Uso sporadico
Pz05	M	23	Psicosi NAS	2006	SI, 25/die	Assente
Pz06	F	27	Psicosi NAS	2005	SI, 10/die	Uso sporadico
Pz07	M	32	Schizofrenia paranoide	2002	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz08	M	46	Disturbo schizoaffettivo	1988	SI, 15/die	Assente
Pz09	F	40	Schizofrenia disorganizzata	1990	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz10	M	35	Schizofrenia paranoide	2000	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz11	F	45	Schizofrenia paranoide	1988	SI, 10/die	Uso sporadico
Pz12	F	45	Schizofrenia paranoide	1988	NO	Uso sporadico
Pz13	M	35	Schizofrenia paranoide	1998	NO	Assente
Pz14	M	30	Disturbo schizoaffettivo	2000	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz15	F	49	Schizofrenia paranoide	1989	NO	Assente
Pz16	F	55	Schizofrenia paranoide	1985	NO	Assente
Pz17	M	33	Schizofrenia paranoide	2000	SI, 25/die	Uso sporadico
Pz18	F	46	Disturbo schizoaffettivo	1990	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz19	M	42	Schizofrenia paranoide	1997	SI, 15/die	Uso sporadico
Pz20	M	35	Schizofrenia paranoide	1980	NO	Uso sporadico
Pz21	M	45	Schizofrenia paranoide	1985	SI, 15/die	Uso sporadico
Pz22	M	55	Schizofrenia paranoide	1978	SI, 10/die	Uso sporadico
Pz23	M	38	Schizofrenia disorganizzata	1985	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz24	M	60	Schizofrenia paranoide	1980	SI, 15/die	Uso sporadico
Pz25	M	32	Schizofrenia paranoide	2002	SI, 20/die	Uso sporadico
Pz26	M	20	Schizofrenia paranoide	2010	SI, 15/die	Uso sporadico
Pz27	F	26	Schizofrenia paranoide	1997	NO	Uso sporadico
Pz28	M	29	Schizofrenia paranoide	2000	SI, 4-25/die	Uso sporadico
Pz29	M	43	Schizofrenia paranoide	1997	NO	Uso sporadico
Pz30	F	37	Psicosi NAS	2001	SI, 10/die	uso sporadico
Pz31	M	39	Disturbo schizofreniforme	1996	NO	Uso sporadico
Pz32	M	35	Disturbo schizoaffettivo	2006	NO	Uso sporadico
Pz33	M	49	Schizofrenia paranoide	1990	NO	Uso sporadico
Pz34	M	43	Schizofrenia paranoide	1991	NO	Uso sporadico
Pz35	F	54	Schizofrenia paranoide	1997	NO	Uso sporadico
Pz36	M	33	Disturbo schizofreniforme	2003	SI, 10/die	Assente
Pz37	F	44	Schizofrenia paranoide	1985	NO	Uso sporadico
Pz38	M	26	Schizofrenia paranoide	2003	NO	Uso sporadico
Pz39	M	29	Schizofrenia paranoide	2001	SI, 25/die	Assente
Pz40	F	37	Schizofrenia paranoide	1994	NO	Assente
Pz41	F	31	Schizofrenia paranoide	1998	NO	Assente
Pz42	F	40	Psicosi NAS	1991	NO	Uso sporadico
Pz43	M	41	Schizofrenia paranoide	1986	NO	Uso sporadico
Pz44	M	64	Sindrome schizoaffettiva	1989	NO	Assente
Pz45	M	44	Schizofrenia paranoide	1989	SI, 20/die	Assente
Pz46	F	42	Schizofrenia paranoide	1988	SI, 20/die	Uso sporadico

Tabella 6. Caratteristiche cliniche della popolazione arruolata.

Relazione tra caratteristiche della popolazione arruolata e risposta clinica al trattamento

Per una prima valutazione sono stati confrontati tra loro i parametri clinici del campione e la risposta alla terapia, considerata in base al punteggio delle scale di valutazione PANSS e GAF. In particolare, i dati relativi a sesso, età dei soggetti e dosaggio di clozapina sono stati incrociati con il punteggio delle *rating scales*, queste ultime considerate sia singolarmente che in associazione tra loro. Sono stati inclusi nella valutazione anche i pazienti che non hanno mostrato risposta significativa a nessuna delle scale.

Su un totale di 46 pazienti è stato osservato quanto segue:

- 13 soggetti hanno mostrato un miglioramento solamente alla PANSS (riduzione del punteggio al T3 pari o superiore al 25% rispetto al T0) con un dosaggio compreso tra 50 mg/die e 400 mg/die (dose media 273,08 mg/die). L'età media di questi soggetti è pari a 41,15 anni.
- 6 soggetti hanno risposto positivamente solo alla GAF (incremento del punteggio al T3 di almeno 20 punti rispetto al T0) con un dosaggio compreso tra 200 mg/die e 500 mg/die (dose media 304,17 mg/die) e una età media di 33,17 anni.
- 17 soggetti hanno risposto positivamente a entrambe le scale, con assunzione di una dose compresa tra 100 mg/die e 400 mg/die (dose media 268,75 mg/die). L'età media di questi pazienti è di 41 anni.
- 10 soggetti non hanno mostrato alcun tipo di miglioramento, con una dose giornaliera compresa tra 100 mg/die e 600 mg/die (dose media 355,55 mg/die) e una età media pari a 39,5 anni.

L'obiettivo di questa prima valutazione è di identificare l'eventuale correlazione tra i suddetti parametri e considerarne il potenziale valore predittivo dell'outcome clinico. Dai risultati ottenuti non sono emerse differenze significative tra pazienti *responders* e *non responders* né riguardo al dosaggio medio né riguardo all'età media: dunque, l'utilizzo dei parametri clinici come strumento predittivo della risposta alla terapia non mostra avere alcuna utilità nella pratica clinica.

Quanto riportato è riassunto in **Tabella 7 e 8**.

	GAF T0	GAF T3	Variazione del punteggio	Risposta	PANSS T0	PANSS T3	Variazione percentuale del punteggio	Risposta
Pz1	20	30	10	NO	124	89	-28,2	SI
Pz2	20	20	0	NO	140	134	-4,3	NO
Pz3	20	30	10	NO	145	129	-11,0	NO
Pz4	40	45	5	NO	85	70	-17,6	NO
Pz5	30	50	20	SI	87	64	-26,4	SI
Pz6	40	50	10	NO	134	106	-20,9	NO
Pz7	40	50	10	NO	85	66	-22,4	NO
Pz8	30	60	30	SI	117	61	-47,9	SI
Pz9	20	40	20	SI	98	84	-14,3	NO
Pz10	20	25	5	NO	102	88	-13,7	NO
Pz11	20	30	10	NO	114	83	-27,2	SI
Pz12	20	40	20	SI	134	110	-17,9	NO
Pz13	10	10	0	NO	160	156	-2,5	NO
Pz14	40	60	20	SI	130	116	-10,8	NO
Pz15	20	30	10	NO	191	157	-17,8	NO
Pz16	21	21	0	NO	154	141	-8,4	NO
Pz17	30	41	11	NO	165	126	-23,6	NO
Pz18	20	50	30	SI	129	48	-62,8	SI
Pz19	30	40	10	NO	117	93	-20,5	NO
Pz20	30	50	20	SI	121	98	-19,0	NO
Pz21	21	50	29	SI	116	88	-24,1	NO
Pz22	21	30	9	NO	133	105	-21,1	NO
Pz23	21	30	9	NO	141	122	-13,5	NO
Pz24	30	60	30	SI	159	78	-50,9	SI
Pz25	30	40	10	NO	126	123	-2,4	NO
Pz26	20	50	30	SI	154	123	-20,1	NO
Pz27	30	51	21	SI	118	109	-7,6	NO
Pz28	21	35	14	NO	126	96	-23,8	NO
Pz29	21	40	19	NO	142	88	-38,0	SI
Pz30	35	51	16	NO	131	84	-35,9	SI
Pz31	21	40	19	NO	143	107	-25,2	SI
Pz32	31	41	10	NO	130	100	-23,1	NO
Pz33	31	51	20	SI	136	89	-34,6	SI
Pz34	21	40	19	NO	145	104	-28,3	SI
Pz35	30	41	11	NO	126	87	-31,0	SI
Pz36	20	40	20	SI	145	100	-31,0	SI
Pz37	30	50	20	SI	128	70	-45,3	SI
Pz38	20	41	21	SI	133	88	-33,8	SI
Pz39	21	60	39	SI	138	63	-54,3	SI
Pz40	21	41	20	SI	129	76	-41,1	SI
Pz41	40	61	21	SI	104	55	-47,1	SI
Pz42	31	60	29	SI	133	88	-33,8	SI
Pz43	21	41	20	SI	151	90	-40,4	SI
Pz44	30	51	21	SI	120	73	-39,2	SI
Pz45	21	50	29	SI	138	78	-43,5	SI
Pz46	21	50	29	SI	133	66	-50,4	SI

Tabella 7. Correlazione tra dati clinici e risposta

Parametri clinici	Risposta			
	PANSS	GAF	PANSS e GAF	Nessuna risposta
Numero di pazienti	13	6	17	10
Genere (M/F)	M=9/F=4	M=3/F=3	M=11/F=6	M=7/F=3
Età media (anni)	41,15	33,17	41	39,5
Dosaggio medio CLZ (mg/die)	273,07	304	268,75	355

Tabella 8. *Correlazione tra dati clinici e risposta.*

Correlazione tra genotipo e risposta alla clozapina

Su un totale di 46 pazienti è stato sino ad ora possibile effettuare l'analisi genetica su 27. Per quanto riguarda il genotipo, le caratteristiche del campione sono riportate in **tabella 9**.

Gene	Genotipo	Numero di pazienti
ABCB1 C1236T	C/C	7
	C/T	13
	T/T	7
ABCB1 C3435T	C/C	8
	C/T	13
	T/T	6
ABCG2 C421A	C/C	18
	C/A	9
CYP1A2 C136A	A/A	6
	A/C	11
	C/C	10
CYP1A2 G3860A	G/G	21
	G/A	6

Tabella 9. *Caratteristiche genotipiche del campione*

I dati relativi ai caratteri genetici dei soggetti arruolati sono stati incrociati con i risultati ottenuti dalle scale di valutazione PANSS e GAF, con l'obiettivo di rintracciare l'esistenza di una eventuale correlazione tra profilo genetico e risposta alla terapia con clozapina.

Nei paragrafi successivi verranno descritti i risultati ottenuti.

Correlazione tra SNPs e PANSS

Per determinare una eventuale correlazione tra SNPs e risposta positiva alla PANSS sono stati messi a confronto i dati relativi ai diversi polimorfismi con la risposta misurata mediante PANSS. I risultati ottenuti hanno permesso di determinare l'esistenza di una correlazione statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra genotipo dei soggetti e risposta alla PANSS (in termini di riduzione del punteggio al T3 $\geq 25\%$).

La **Tabella 10** mostra la correlazione tra PANSS e i polimorfismi dei geni ABCB1 e ABCG2. Dal prospetto si evince che soggetti portatori degli SNPs ABCB1 3435T e ABCG2 421C, che *in vivo* si associano a ridotta attività di trasporto, hanno una probabilità significativamente maggiore di presentare una risposta positiva alla PANSS con un O.R rispettivamente di 35 e 12,25. Questo risultato sarebbe indicativo di un miglioramento del profilo psicopatologico rispetto ai soggetti portatori di forme alleliche associate a elevata capacità di trasporto.

Per quanto riguarda gli SNPs del CYP1A2 i risultati sono differenti.

Come illustrato in **Tabella 11**, infatti, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa tra tali polimorfismi e i risultati della PANSS.

gene	SNP	Genotipo	PANSS		OR (95% CI)	P
			NO	SI		
ABCB1	C1236T	C/C	6 (37.5%)	1 (9.1%)	15.00 (1.03-218.31)	0.08
		C/T	8 (50%)	5 (45.5%)		
		T/T	2 (12.5%)	5 (45.5%)		
ABCB1	C3435T	C/C	7 (43.8%)	1 (9.1%)	35.00 (1.74-703.03)	<u>0.021</u>
		C/T	8 (50%)	5 (45.5%)		
		T/T	1 (6.2%)	5 (45.5%)		
ABCG2	C421A	C/C	14 (87.5%)	4 (36.4%)	12.25 (1.79-83.95)	<u>0.005</u>
		C/A	2 (12.5%)	7 (63.6%)		

Tabella 10. Correlazione tra SNPs di ABCB1 e ABCG2 e risposta alla PANSS.

gene	SNP	Genotipo	PANSS		OR (95% CI)	P
			NO	SI		
CYP1A2	C163A	C/C	2 (12.5%)	4 (36.4%)	0.29 (0.04-2.32)	0.33
		C/A	7 (43.8%)	4 (36.4%)		
		A/A	7 (43.8%)	3 (27.3%)		
CYP1A2	G3860A	G/G	12 (75%)	9 (81.8%)	0.67 (0.10-4.48)	0.67
		G/A	4 (25%)	2 (18.2%)		

Tabella 11. *Correlazione tra SNPs di CYP1A2 e risposta alla PANSS.*

Correlazione tra SNPs e GAF.

In una ulteriore elaborazione abbiamo confrontato i polimorfismi con la risposta alla GAF. In questo caso, non è stata individuata alcuna correlazione statisticamente significativa tra SNPs a livello di trasportatori della clozapina e GAF (**Tabella 12**). Anche per quanto concerne gli SNPs del CYP1A2, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa (**Tabella 13**).

gene	SNP	Genotipo	GAF		OR (95% CI)	P-value
			NO	SI		
ABCB1	C1236T	C/C	5 (31.2%)	2 (18.2%)	2.14 (0.30-15.36)	0.73
		C/T	7 (43.8%)	6 (54.5%)		
		T/T	4 (25%)	3 (27.3%)		
ABCB1	C3435T	C/C	5 (31.2%)	3 (27.3%)	1.04 (0.17-6.40)	0.87
		C/T	8 (50%)	5 (45.5%)		
		T/T	3 (18.8%)	3 (27.3%)		
ABCG2	C421A	C/C	10 (62.5%)	8 (72.7%)	0.63 (0.12-3.32)	0.58
		C/A	6 (37.5%)	3 (27.3%)		

Tabella 12. *Correlazione tra SNPs dei geni ABCB1 e ABCG2 e risposta alla GAF*

gene	SNP	Genotype	GAF		OR (95% CI)	P-value
			NO	SI		
CYP1A2	C136A	C/C	2 (12.5%)	4 (36.4%)	0.11 (0.01-1.09)	0.1
		C/A	9 (56.2%)	2 (18.2%)		
		A/A	5 (31.2%)	5 (45.5%)		
CYP1A2	G3860A	G/G	14 (87.5%)	7 (63.6%)	4.00 (0.58-27.41)	0.14
		G/A	2 (12.5%)	4 (36.4%)		

Tabella 13. *Correlazione tra SNPs del CYP1A2 e risposta alla GAF.*

Correlazione tra aplotipi e risposta alla clozapina.

Si definisce *aplotipo* una combinazione di varianti alleliche tutte coinvolte nella risposta a un particolare farmaco.

Ricercare una correlazione tra aplotipi e risposta clinica alla clozapina significa mettere a confronto le “combinazioni alleliche” sia degli SNPs dei geni ABCB1 ed ABCG2 che del CYP1A2 con i risultati della PANSS e della GAF.

Dall’analisi dei dati ottenuti emerge l’esistenza di una correlazione statisticamente significativa tra risposta alla PANSS e alcuni aplotipi. La combinazione di alcune forme alleliche che già singolarmente predispongono il soggetto a una risposta positiva si correla significativamente con la risposta alla PANSS. In particolare è stato osservato che i soggetti portatori della combinazione allelica -TTA hanno una maggiore probabilità di rispondere positivamente alla PANSS rispetto agli altri pazienti, con una odds ratio di 30.7 (1.80 – 513.4).

Al contrario, per quanto riguarda le combinazioni alleliche degli SNPs del CYP1A2, non è stata dimostrata alcuna correlazione significativa con la risposta alla terapia sia misurata tramite PANSS (**Tabella 14**) che mediante GAF (**Tabella 15**).

	ABCB1 C1236T	ABCB1 C3435T	ABCG2 C421A	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	C	C	C	0.4792	1.00	---
2	T	T	C	0.3171	6.45 (0.63 - 65.57)	0.13
3	T	T	A	0.1458	30.7 (1.8 - 513.4)	0.026
4	T	C	C	0.037	0.00 (-Inf - Inf)	1
rare	*	*	*	0.0208	1.6 (0.56 - 56.33)	0.51

Tabella 14. *Correlazione tra aplotipi ABCB1/ABCG2 e PANSS.*

	CYP1A2 C163A	CYP1A2 G3860A	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	A	G	0.5527	1.00	---
2	C	G	0.3362	3.01 (0.70 - 12.94)	0.15
3	C	A	0.0897	0.79 (0.10 - 6.28)	0.82
rare	*	*	0.0214	0.00 (-Inf - Inf)	1

Tabella 15. *Correlazione tra aplotipi CYP1A2 e PANSS.*

Per quanto riguarda la risposta alla GAF, i risultati finora ottenuti non hanno permesso di dimostrare una correlazione significativa né per quanto riguarda gli aplotipi formati dagli SNPs presenti nei geni codificanti per le proteine di trasporto (**Tabella 16**), né per gli aplotipi formati dagli SNPs nel CYP1A2 (**Tabella 17**)

	ABCB1 C1236T	ABCB1 C3435T	ABCG2 C421A	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	C	C	C	0.4744	1.00	---
2	T	T	C	0.3404	1.63 (0.34 - 7.94)	0.55
3	T	T	A	0.1226	1.16 (0.18 - 7.36)	0.88
4	T	C	C	0.0185	5,8 (0,9 - 263,6)	0.91
rare	*	*	*	0.0441	1,59 (0,39 - 15,89)	0,59

Tabella 16. *Correlazione tra aplotipi ABCB1/ABCG2 e GAF.*

	CYP1A2 C163A	CYP1A2 G3860A	Freq	OR (95% CI)	P-value
1	A	G	0.5556	1.00	---
2	C	G	0.3333	0.97 (0.25 - 3.73)	0.96
3	C	A	0.0926	3.01 (0.40 - 22.60)	0.29
rare	*	*	0.0185	0,69 (0,056 - 5,89)	0,25

Tabella 17. *Correlazione tra aplotipi CYP1A2 e GAF.*

DISCUSSIONE

In campo psichiatrico è noto ormai da tempo che la risposta agli psicofarmaci varia in maniera considerevole tra i diversi pazienti e, dopo numerosi anni di ricerche, è ormai comunemente condivisa l'idea che la variabilità della risposta non possa essere spiegata soltanto attraverso i fattori fisiologici, patologici o ambientali. Inoltre, il monitoraggio dei livelli plasmatici di clozapina non sembra essere un metodo sufficiente per la previsione della risposta alla terapia, mentre si considera che lo studio del profilo genetico dei soggetti possa svolgere in tal senso un ruolo più determinante (Wilffert et al., 2005; de Leon et al., 2007).

All'inizio di questo studio ci si attendeva, come risultato, la possibilità di prevedere il tipo di risposta per ciascun soggetto in trattamento con CLZ, in termini di efficacia della cura, grazie alla correlazione con il profilo genetico (e dunque metabolico e farmacocinetico) di ciascun paziente.

I risultati ipotizzati venivano così riassunti:

- l'aplotipo del CYP1A2 e i polimorfismi di ABCB1 e ABCG2 sono correlati alla risposta clinica al farmaco;
- aplotipi "poor metabolizer" vanno più facilmente incontro a effetti collaterali, mancata compliance, problemi di gestione della terapia, necessità di riduzione della posologia;
- aplotipi "extensive metabolizer" necessitano di dosaggi farmacologici maggiori per ottenere risposte cliniche adeguate o si comportano come *non responders*.

Rispetto a questa tesi iniziale è stato possibile elaborare le seguenti considerazioni.

Attraverso la somministrazione delle scale PANSS e GAF è stato possibile individuare una correlazione statisticamente significativa tra la risposta clinica alla clozapina e gli SNPs del sistema delle proteine trasportatrici ABC, considerati sia singolarmente che in

combinazione allelica. Per quanto riguarda gli SNPs del CYP 1A2, invece, non sono state rilevate associazioni significative con la risposta a nessuna delle due scale.

I dati più interessanti, dunque, non si riferiscono tanto alla maggiore o minore funzionalità o attività degli enzimi epatici deputati alla biotrasformazione di clozapina, quanto alla maggiore o minore espressione e attività delle proteine della famiglia ABC, implicate nel trasporto del farmaco.

In particolare, è stato osservato che i soggetti portatori del genotipo ABCB1.C3435 T/T hanno una probabilità di sviluppare una risposta positiva al trattamento con clozapina (misurata attraverso l'osservazione di un miglioramento del risultato alla PANSS) 35 volte superiore rispetto ai genotipi *wild type* ed eterozigote corrispondenti (ABCB1.C3534 C/C e C/T). Per quanto riguarda il gene ABCG2, i soggetti portatori del genotipo C421A C/A hanno una probabilità di rispondere positivamente alla terapia 12 volte maggiore rispetto ai soggetti *wild type*.

L'espressione di tali genotipi si traduce, *in vivo*, in una ridotta espressione della proteina PGP o in una sua ridotta attività a livello dell'intestino tenue, con conseguente decremento dell'eliminazione di clozapina dall'organismo del soggetto. Ciò, almeno in linea teorica, potrebbe condurre a un "accumulo" di CLZ che essendo depurata dall'organismo con minore efficienza si tradurrebbe in livelli ematici più elevati dell'antipsicotico a parità di dosaggio giornaliero. L'aumento della biodisponibilità del farmaco favorirebbe la sua azione sul SNC e quindi sui sintomi della psicopatologia di base con conseguente registrazione del miglioramento clinico e risposta positiva alla PANSS.

Le considerazioni effettuate sono in linea con quanto riportato in letteratura da Jacquenod et al., 2009, che hanno condotto uno studio su 75 pazienti in terapia con CLZ nel quale viene indagato il ruolo svolto da alcuni fattori genetici come i polimorfismi

del CYP450 e della ABCB1 nell'influencare il profilo farmacocinetico dell'antipsicotico. Dallo studio è emerso che i portatori del genotipo 3435TT per la ABCB1 tendono a presentare concentrazioni plasmatiche di CLZ superiori rispetto ai portatori di altri genotipi.

Una seconda importante osservazione riguarda il fatto che i risultati più evidenti e le correlazioni più significative tra genotipo e risposta clinica sono state registrate attraverso la somministrazione della PANSS, ma non della GAF. Questa particolarità, apparentemente contraddittoria, potrebbe essere spiegata sulla base delle caratteristiche delle due differenti scale. Infatti, la PANSS è una scala "psicopatologica" che, attraverso la valutazione dei sintomi positivi e negativi della schizofrenia, rappresenta un indice piuttosto sensibile che consente di riconoscere il miglioramento clinico del soggetto dopo l'introduzione della terapia farmacologica.

La GAF, invece, è una scala che consente la valutazione del funzionamento sociale del soggetto; tale funzionamento, anche dopo l'eventuale riduzione importante della sintomatologia psicotica, può migliorare in maniera poco significativa o, comunque, non proporzionata al miglioramento sul piano clinico (per es. il soggetto mostra minori sintomi produttivi, deliranti e/o allucinatori, ma non riesce comunque a migliorare le proprie performances in ambito sociale, familiare, lavorativo etc. etc.).

È dunque possibile che un soggetto presenti un importante miglioramento sul piano clinico e psicopatologico non affiancato da un corrispondente miglioramento sul piano del funzionamento globale. Questo concorda con i risultati ottenuti in questo studio.

VI. CONCLUSIONI

L'introduzione di clozapina nella pratica clinica ha rappresentato un'importante svolta per i trattamenti psicofarmacologici: questa molecola, infatti, presenta un profilo di efficacia unico rispetto a qualunque altro antipsicotico in commercio e, al netto delle valutazioni effettuate finora, i benefici superano i rischi legati al trattamento. Attualmente la clozapina è l'unico antipsicotico evidence-based indicato per il trattamento della schizofrenia resistente (Kane e Correl, 2010). La sua efficacia clinica nel trattamento della schizofrenia resistente è stata dimostrata in circa il 50-60% dei pazienti, con importante riduzione non solo della sintomatologia psicopatologica, ma anche della frequenza di comportamenti anticonservativi e del numero di ricoveri (Asenjo Lobos et al., 2010; Nyakyoma e Morriss, 2010).

Nonostante l'ormai dimostrata utilità clinica, la clozapina resta un farmaco sottoutilizzato (Joober e Boksa, 2010), in parte per la scarsa maneggevolezza legata ai diversi possibili effetti avversi, in parte per le scarse conoscenze disponibili in merito al meccanismo per il quale il 40-50% dei pazienti schizofrenici, resistenti al trattamento con altri antipsicotici, presenta risposta insoddisfacente anche alla clozapina.

Uno strumento che negli ultimi tempi, grazie anche ai progressi della biologia molecolare, si è rivelato potenzialmente molto utile per cercare di risolvere i dubbi in merito all'impiego di clozapina nell'ambito clinico è lo studio del profilo genetico dei singoli soggetti; infatti, è ormai opinione condivisa che fattori di ordine genetico svolgano un importante ruolo nel determinare la variabilità di risposta alla clozapina (Wilffert et al., 2005). Il lavoro svolto in questo studio prende spunto proprio da questa premessa.

In questo lavoro è stato valutato il ruolo svolto da fattori genetici nel determinare la variabilità della risposta alla clozapina, considerata in termini di efficacia terapeutica. In

particolare, sono stati presi in considerazione i polimorfismi dei principali geni in grado di influenzare il profilo farmacocinetico di tale antipsicotico: gli SNPs dei geni che codificano per il CYP450 1A2 e dei geni ABCB1 e ABCG2 che codificano per i trasportatori del farmaco. È stata dunque valutata la presenza di una correlazione tra gli SNPs dei trasportatori della famiglia ABC e di quelli del CYP1A2, sia da soli che in combinazione (aplotipo), con la risposta alla terapia misurata attraverso la somministrazione a pazienti affetti da schizofrenia o altro disturbo psicotico, secondo il DSM-IV TR, delle scale PANSS e GAF. Risultati positivi sono emersi per quanto riguarda la correlazione tra la presenza di determinati SNPs nei geni ABCB1 e ABCG2 e la risposta alla PANSS (miglioramento dello stato psicopatologico), meno per quanto riguarda la risposta alla GAF (miglioramento del funzionamento psicosociale).

Per quanto concerne gli SNPs del gene CYP1A2, invece, non è stata rilevata alcuna correlazione significativa con la risposta a nessuna delle due scale.

È doveroso sottolineare che la difficoltà incontrata nel reperire soggetti in possesso delle caratteristiche necessarie per questo studio è da attribuire verosimilmente al fatto che il trattamento con clozapina, a causa della scarsa maneggevolezza del farmaco, non viene generalmente considerato dai clinici come trattamento di “prima scelta” e viene pertanto impostato in un numero limitato di pazienti che soffrano di un disturbo schizofrenico risultato “resistente” agli altri trattamenti antipsicotici.

I risultati ottenuti richiedono certamente ulteriori approfondimenti in merito, possibilmente attraverso l'aumento della numerosità del campione, con l'obiettivo di determinare con maggior precisione le relazioni esistenti tra profilo genetico e risposta alla clozapina. Questo potrebbe consentire, in una prospettiva a lungo termine, di impostare una terapia “personalizzata”, sulla base delle caratteristiche genotipiche e fenotipiche di ogni singolo paziente.

Infine, siamo in attesa di completare lo studio con l'inserimento dei dati relativi alla clozapinemia e potere quindi correlare i dati genetici e clinici descritti in questa tesi con i livelli plasmatici di clozapina; ciò sarà possibile non appena il metodo per la misurazione della clozapinemia verrà validato e certificato.

VII. APPENDICE

**POSITIVE AND NEGATIVE SYNDROME SCALE
(PANSS)**

ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE	
<p>Valutare il punteggio appropriato per ogni dimensione seguendo la specifica intervista clinica. Consultare il Manuale di Valutazione per la definizione degli items, la descrizione dei punti di riferimento e la procedura di conteggio.</p> <p>0 = non valutabile; 1 = assente; 2 = molto lieve; 3 = lieve; 4 = moderato;</p> <p>5 = moderatamente grave; 6 = grave; 7 = estremamente grave</p>	
SINTOMI POSITIVI	
P1	DELIRI
P2	DISORGANIZZAZIONE CONCETTUALE
P3	COMPORTAMENTO ALLUCINATORIO
P4	ECCITAMENTO
P5	GRANDIOSITÀ
P6	SOSPETTOSITÀ/PERSECUZIONE
P7	OSTILITÀ
SINTOMI NEGATIVI	
N1	APPIATTIMENTO AFFETTIVO
N2	RITIRO EMOZIONALE
N3	RAPPORTO INSUFFICIENTE
N4	RITIRO SOCIALE PASSIVO/APATICO
N5	DIFFICOLTÀ NEL PENSIERO ASTRATTO
N6	MANCANZA DI SPONTANEITÀ E FLUIDITÀ NELL COLLOQUIO
N7	PENSIERO STEREOTIPATO
SINTOMI GENERALI	
G1	PREOCCUPAZIONE SOMATICA
G2	ANSIA
G3	SENTIMENTI DI COLPA
G4	TENSIONE
G5	MANIERISMI POSTURALI
G6	DEPRESSIONE

G7	RALLENTAMENTO MOTORIO
G8	NON COOPERATIVITÀ
G9	CONTENUTO INSOLITO DEL PENSIERO
G10	DISORIENTAMENTO
G11	POVERTÀ ATTENTIVA
G12	PERDITA DI GIUDIZIO E INSIGHT
G13	DISTURBI DELLA VOLONTÀ
G14	SCARSO CONTROLLO DEGLI IMPULSI
G15	PREOCCUPAZIONE
G16	RITIRO SOCIALE ATTIVO

**GLOBAL ASSESSMENT OF FUNCTIONING
(GAF)**

100 - 91	Funzionamento superiore alla norma in un ampio spettro di attività. I problemi della vita non sembrano mai sfuggire di mano, è ricercato dagli altri per le sue numerose qualità positive. Nessun sintomo.
90 – 81	Sintomi assenti o minimi; buon funzionamento in tutte le aree, interessato e coinvolto in un ampio spettro di attività, socialmente efficiente, in genere soddisfatto della vita. Nessun problema o preoccupazione oltre a quelli della vita quotidiana.
80 – 71	Se sono presenti sintomi, essi rappresentano reazioni transitorie e attendibili a stimoli psicosociali stressanti; lievissima alterazione del funzionamento sociale, occupazionale o scolastico.
70 – 61	Alcuni sintomi lievi; oppure alcune difficoltà nel funzionamento sociale, occupazionale, scolastico; ma in genere funziona abbastanza bene ed ha alcune relazioni interpersonali significative.
60 – 51	Sintomi moderati oppure moderate difficoltà nel funzionamento sociale, lavorativo, scolastico.
50 – 41	Sintomi gravi; oppure qualsiasi grave alterazione nel funzionamento sociale, lavorativo, scolastico.
40 – 31	Alterazioni nei test di realtà o nella comunicazione; oppure menomazione grave in alcune aree, quali il lavoro o la scuola, le relazioni familiari, la capacità di giudizio, il pensiero o l'umore.
30 – 21	Il comportamento è considerevolmente influenzato da deliri o allucinazioni; oppure grave alterazione della comunicazione o della capacità di giudizio; oppure incapacità di funzionare in quasi tutte le aree.
20 – 11	Qualche pericolo di far del male a se stesso o agli altri; oppure occasionalmente non riesce a mantenere l'igiene personale minima; oppure grossolana alterazione della comunicazione.
10 – 1	Persistente pericolo di far del male a se stesso o agli altri; oppure persistente incapacità di mantenere l'igiene personale minima; oppure grave gesto suicida con chiara aspettativa di morire.

VIII. BIBLIOGRAFIA

ACKENHEIL VM, BRAU H, BURKHART A, FRANKE A, PACHA W: *Antipsychotic efficacy in relation to plasma levels of clozapine*. *Arzneimittelforschung*, 1976; 26: 1156-1158 (German; English abstract).

ADAMASZEK M, OLBRICH S, HEGERL U, SHONKNECHT P: *The risk for myocarditis of clozapine and other atypical antipsychotics: case report and study of the literature*. *Psychiatr Prax*. 2011 May;38(4):201-3. Epub 2011 May 5. German.

AGID O, FOUSSIAS G, SINGH S, REMINGTON G: *Where to position clozapine: re-examining the evidence*. *Can J Psychiatry*. 2010 Oct; 55(10): 677-84.

AITCHISON KJ, JANN MW, ZHAO JH, SAKAI T, ZAHER BH, WOLFF K, COLLIER DA, KERWIN RW, GONZALEZ FJ: *Clozapine pharmacokinetics and pharmacodynamics studied with CYP1A2-null mice*. *J Psychopharmacol*. 2000; 14(4): 353-9.

AITCHISON KJ, GILL M: *Pharmacogenetics in the postgenomic era*. In *Behavioral Genetics in the Postgenomics Era*. Edited by Plomin R, Defries JC, Craig IW, McGuffin P. Washington DC: American Psychological Association; 2003: 335-361.

ALBAIRAK ÖZLAMETE O, CEYLAN M, ÖZLAMETE O, EFE SEVİM M: *Antipsychotic polypharmacy in Schizophrenic inpatients*. *Archives of Neuropsychiatry* 2010; 47: 23-8

ALISKY JM: *Cerebroventricular clozapine would be a viable treatment modality for clozapine-dependent schizophrenia patients with neutropenia*. *Med Hypotheses*. 2012 Jul 18

ALVIR MJ, LIEBERMAN JA, SAFFERMAN AZ, et al: *Clozapine-induced agranulocytosis: incidence and risk factors in the United States*. *N Engl J Med*, 1993; 329: 162-167.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION: *DSM-IV-TR, Manuale Diagnostico e Statistico dei Disturbi Mentali – Text Revision*. Masson, 2002.

AMES D, CARTER J, WIRSHING WC, et al: *Clozapine associated eosinophilia and neutropenia*. *Schizophr Res*, 1995; 15: 12.

AMSLER HA, TEERENHOVI L, BARTH E, et al: *Agranulocytosis in patients treated with clozapine: a study of the Finnish epidemic*. *Acta Psychiatr Scand*, 1977; 56: 241-248.

ANDERSON ES, POWERS PS: *Neuroleptic malignant syndrome associated with clozapine use*. *J Clin Psychiatry*, 1991; 52: 102-104.

ANGST J, BENTE D, BERNER P, et al (1971), in CASSANO GB et al, *Guida all'impiego della clozapina nella pratica psichiatrica*. Il Pensiero Scientifico Editore, 1996.

- ARRANZ MJ, DE LEON J: *Pharmacogenetic and pharmacogenomics of schizophrenia: a review of last decade of research*. Molecular Psychiatry, 2007; 12: 707-747.
- ARRANZ MJ, RIVERA M, MUNRO JC.: *Pharmacogenetics of response to antipsychotics in patients with schizophrenia*. CNS Drugs. 2011 Nov 1;25(11):933-69. doi: 10.2165/11595380-000000000-00000.
- ASENJO LOBOS C, KOMOSSA K, RUMMEL-KLUGE C, HUNGER H, SCHMID F, SCHWARZ S, LEUCHT S: *Clozapine versus other atypical antipsychotics for schizophrenia*. Cochrane Database Syst Rev. 2010 Nov 10; 11:CD006633.
- ATHANASIOU MC, DETTLING M, CASCORBI I, MOSYAGIN I, SALISBURY BA, PIERZ KA, et al.: *Candidate gene analysis identifies a polymorphism in HLA-DQB1 associated with clozapine-induced agranulocytosis*. J Clin Psychiatry. 2010 Sep 21. [Epub ahead of print]
- ATTARD A, TAYLOR DM: *Comparative Effectiveness of Atypical Antipsychotics in Schizophrenia: What have Real-World Trials Taught Us?*. CNS Drugs. 2012 Jun 1;26(6):491-508. doi: 10.2165/11632020-000000000-00000.
- AVENOSO A, FACCIOLÀ G, SCORDO MG, et al: *No effect of citalopram on plasma concentration of clozapine, risperidone and their active metabolites in patients with chronic schizophrenia*. Clin Drug Invest, 1998; 16: 393-398.
- BAI YM, LIN CC, CHEN JY, CHEN TT, SU TP, CHOU P: *Association of weight gain and metabolic syndrome in patients taking clozapine: an 8-year cohort study*. J Clin Psychiatry. 2011 Jun;72(6):751-6. Epub 2010 Nov 30.
- BAIG MR, NAVAIRA E, ESCAMILLA MA, RAVENTOS H, WALSS-BASS C: *Clozapine treatment causes oxidation of proteins involved in energy metabolism in lymphoblastoid cells: a possible mechanism for antipsychotic-induced metabolic alterations*. J Psychiatr Pract. 2010 Sep;16(5):325-33.
- BALDESSARINI RJ, FRANKENBURG FR: *Clozapine*. N Engl J Med, 1991; 324: 746-754.
- BANOV MD, TOHEN M, FRIEDBERG J: *High risk of eosinophilia in women treated with clozapine*. J Clin Psychiatry, 1993; 54: 466-469.
- BARBINI B, SCHERILLO P, SMERALDI E, et al: *Response to clozapine in acute mania in more rapid than of chlorpromazine*. Int Clin Psychopharmacol, 1997; 12(2): 109-112.
- BASILE VS, MASELLIS M, McINTYRE RS, MELTZER HY, LIEBERMAN JA, KENNEDY JL: *Genetic dissection of atypical antipsychotic induced weight gain: novel preliminary data on the pharmacogenetic puzzle*. J Clin Psychiatry, 2001; 62 (Suppl. 23): 45-66.

- BASILE VS, MASELLIS M, POTKIN SG, KENNEDY JL: *Pharmacogenomics in schizophrenia: the quest for individualized therapy*. Hum Mol Genet, 2002 Oct 1, 11(20): 2517-30.
- BELL R, McLAREN A, GALANOS J, COPOLOV D: *The clinical use of plasma clozapine levels*. Australian and New Zealand Journal of Psychiatry, 1998; 32: 567-574.
- BENEDETTI A, DI PAOLO A, LASTELLA M, et al: *Augmentation of Clozapine with Aripiprazole in Severe Psychotic Bipolar and Schizoaffective Disorders: A Pilot Study*. Clinical Practice & Epidemiology in Mental Health, 2010, 6, 30-35.
- BENEDETTI F, SFORZIONI L, COLOMBO C, MAFFEI C, SMERALDI E: *Low-dose clozapine in acute and continuation treatment of severe borderline personality disorder*. J Clin Psych, 1998; 59(3): 103-7.
- BERMAN I, ZALMA A, DuRAND CJ, GREEN AI: *Clozapine-induced myoclonic jerks and drop attacks*. J Clin Psychiatry, 1992; 53: 300-329.
- BERNARDO M, COMA A, ZARA C, et al.: *Antipsychotic polypharmacy in a regional health service: a population-based study*. BMC Psychiatry. 2012 May 15;12(1):42.
- BERTILSSON L, CARRILLO JA, DAHL ML, et al: *Clozapine disposition covaries with CYP1A2 activity determined by a caffeine test*. Br J Clin Pharmacol, 1994; 38: 471-473.
- BESAG FMC, BERRY D: *Interactions between antiepileptic and antipsychotic drugs*. Drug Saf, 2006; 29: 95-118.
- BHIDAYASIRI R, BOONYAWAIROJ S: *Spectrum of tardive syndromes: clinical recognition and management*. Postgrad Med J. 2010 Dec 3. [Epub ahead of print]
- BIRD AM, SMITH TL, WALTON AE: *Current treatment strategies for clozapine-induced sialorrhea*. Ann Pharmacother. 2011 May;45(5):667-75. Epub 2011 May 3.
- BOLOGA M, TANG B, KLEIN J, TESORO A, KOREN G: *Pregnancy-induced changes in drug metabolism in epileptic women*. J Pharmacol Exp Ther, 1991; 257(2): 735-40.
- BORBA C, HENDERSON D: *Citalopram and clozapine: potential drug interaction*. J Clin Psychiatry, 2000; 61: 301-302.
- BORISON RL, DIAMOND BI, SINHA D, et al: *Clozapine withdrawal rebound psychosis*. Psychopharmacol Bull, 1988; 24: 260-263.
- BORTOLASO P, BOLLA E, FERRARI M, CECCON F, MARINO F, LECCHINI S, COSENTINO M, VENDER S: *Are adverse reactions to clozapine genetically predictable considering cythochrome P450 1A2 haplotype?*. Panminerva Medica, settembre 2009 (lavoro presentato al 20th World Congress on pstchosomatic medicine – Torino 23-26 settembre 2009).

- BRAU VH, BURKHART A, PACHA W, ACKENHEIL VM: *Relationships between effects and plasma levels of clozapine*. *Arzneimittelforschung*, 1978; 28: 1300 (German; English abstract).
- BRENNER HD, DENCKER SJ, GOLDSTEIN MJ, et al: *Defining treatment refractoriness in schizophrenia*. *Schizophr Bull*, 1990; 16(4): 551-561.
- BROSEN K, SKIELBO E, RASMUSSEN BB, et al: *Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P4501A2*. *Biochem Pharmacol*, 1993; 45: 1211-1214.
- BROWN TM, STOUDEMIRE A: *Effetti collaterali neuropsichiatrici dei farmaci*, Centro Scientifico Ed., 1999.
- BUCHANAN RW, BREIER A, KIRKPATRICK B, et al: *Positive and negative symptom response to clozapine in schizophrenic patients with and without the deficits syndrome*. *Am J Psych*, 1998; 155: 751-760.
- BYERLY MJ, DE VANE CL: *Pharmacokinetics of clozapine and risperidone: a review of recent literature*. *J Clin Psychopharmacol*, 1996; 16(2): 177-87.
- CARRILLO JA, JERLING M, BERTILSSON L: *Comments to "interaction between caffeine and clozapine"*. *J Clin Psychopharmacol*, 1995; 15: 376-377.
- CARRILLO JA, HERRAIZ AG, RAMOS SI, GERVASINI G, VIZCAINO S, BENITEZ J: *Role of smoking-induced cytochrome P450 (CYP) 1A2 and polymorphic CYP2D6 in steady-state concentration of olanzapine*. *J Clin Psychopharmacol*, 2003; 23: 119-27.
- CASEY DE: *Clozapine: neuroleptic-induced EPS and tardive dyskinesia*. *Psychopharmacology*, 1989; (Berl) 99 (suppl): S47-S53.
- CASLEY WL, LEBLANC-WESTWOOD CA: *Assay for the simultaneous detection of the *1C and *1F alleles of the CYP1A2 gene by real-time polymerase chain reaction and melting curve analysis*. *Psychiatr Genet*, 2006; 16(2): 81-3.
- CASSANO GB, LAMBERTENGHI DELILIERI G, PANCHERI P, RACAGNI G: *Guida all'impiego della clozapina nella pratica psichiatrica. Tollerabilità e interazioni*. Il Pensiero Scientifico Editore, 1996.
- CENTORRINO F, BALDESSARINI RJ, KANDO J, FRANKENBURG FR, VOLPICELLI SA, FLOOD JG: *Serum concentrations of clozapine and its metabolites: effects of cotreatment with fluoxetine or valproate*. *Am J Psychiatry*, 1994; 151: 123-5.
- CENTORRINO F, BALDESSARINI RJ, FRANKENBURG FR, KANDO J, VOLPICELLI SA, FLOOD JG: *Serum levels of clozapine and norclozapine in patients treated with selective serotonin reuptake inhibitors*. *Am J Psychiatry*, 1996; 153: 820-3.
- CHANG WH, et al: *Clozapine dosages and plasma drug concentrations*. *J. Formos. Med. Assoc.*, 1997; 96: 599-605.

CHENG YF, LUNDBERG T, BONDESSON U, LINDSTRÖM L, GABRIELSSON J: *Clinical pharmacokinetics of clozapine in chronic schizophrenic patients*. Eur J Clin Pharmacol, 1988; 34 (5): 445-9.

CHOC MG, HSUAN F, HONIGFELD G, et al: *Single - vs multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in psychiatric patients*. Pharm Res, 1990; 7(4): 347-51.

CHONG SA, TAN CH, LEE HS: *Worsening of psychosis with clozapine and selective serotonin reuptake inhibitor combination: two case reports*. J Clin Psychopharmacol, 1997; 17: 68-69.

CIAPPARELLI A, DELL'ORSO L, CASSANO GB, et al: *Clozapine for treatment-refractory schizophrenia, schizoaffective disorder, and psychotic bipolar disorder: a 24-month naturalistic study*. J Clin Psych, 2000; 61: 329-334.

CITROME L, BILDER RM, VOLAVKA J: *Managing treatment-resistant schizophrenia: evidence from randomised clinical trials*. J Psychiatr Pract, 2002; 8(4): 205-15.

COHEN D: *Clozapine screening: white bloodcell counts no longer sufficient*. Tijdschr Psychiatr. 2010;52(11):785-90. Dutch.

COHEN S, CHILES J, McNAUGHTON A: *Weight gain associated with clozapine*. Am J Psychiatry, 1990; 147: 503-504.

COHEN LG, CHESLEY S, EUGENIO L, et al: *Erythromycin-induced clozapine toxic reaction*. Arch Intern Med, 1996; 156: 675-677.

CONSOLI G, LASTELLA M, CIAPPARELLI A, et al.: *ABCB1 polymorphisms are associated with clozapine plasma levels in psychotic patients*. Pharmacogenomics. 2009 Aug; 10(8): 1267-76.

CORMAC I, BROWN A, CREASEY S, FERRITER M, HUCKSTEP B: *A retrospective evaluation of the impact of total smoking cessation on psychiatric inpatients taking clozapine*. Acta Psychiatr Scand. 2010 May; 121(5): 393-7. Epub 2009 Oct 13.

COSTA JL, SMITH G, WATSON M, LIN JM, CALLON K, GAMBLE G, CHENG A, VICJERS MH, SHEPHERD PR, COMISH J, GREY A: *The atypical antipsychotic Clozapine decreases bone mass in rats in vivo*. Schizophr Res. 2011 Mar;126(1-3):291-7. Epub 2010 Dec 23.

CREMERS TI, FLIK G, HOFLAND C, STRAFORD RE: *Microdialysis Evaluation of Clozapine and N-desmethylozapine Pharmacokinetics in Rat Brain*. Drug Metab Dispos. 2012 Jun 26.

CREWE HK, LENNARD MS, TUCKER GT, et al: *The effect of selective serotonin re-uptake inhibitors on cytochrome P4502D6 (CYP2D6) activity in human liver microsomes*. Br J Clin Pharmacol., 1992; 34: 262-265.

CROISSANT B, HERMANN D, OLBRICH R: *Reduction of side effects by combining clozapine with amisulpride: case report and short review of clozapine-induced hypersalivation - a case report*. Pharmacopsychiatry, 2005; 38(1): 38-9.

DAHL ML: *Cytochrome P450 phenotyping/genotyping in patients receiving antipsychotics: useful aid to prescribing?*. Clin Pharmacokinet, 2002; 41(7): 453-70.

DALY AK, CHOLERTON S, GREGORY W, IDLE JR: *Metabolic polymorphisms*. Pharmacol Ther, 1993; 57(2-3): 129-60.

DAS GUPTA K, YOUNG A: *Clozapine-induced neuroleptic malignant syndrome*. J Clin Psychiatry, 1991; 52: 105-107.

DAY JC, GRAHAM W, DEWEY MIKE, BENTALL RP: *A Self Rating Scale for Measuring Neuroleptic Side-Effects. Validation in a group of schizophrenic patients*. British Journal of Psychiatry, 1995; 166: 650-653.

DE BERNARDIS D, SERRONI N, CAMPANELLA D, et al.: *Safety and efficacy of combined clozapine-azathioprine treatment in a case of resistant schizophrenia associated with Behçet's disease: a 2-year follow-up*. Gen Hosp Psychiatry. 2012 Jul 20.

DE BERNARDIS D, SERRONI N, CAMPANELLA D, et al.: *Update on the adverse effects of clozapine: focus on myocarditis*. Curr Drug Saf. 2012 Feb 1;7(1):55-62.

DE BRUIN GJ, BAC DJ, VAN PUIJENBROEK EP, VAN DER KLOOSTER JM: *Ogilvie Syndrome induced by Clozapine*. Ned Tijdschr Geneesk. 2009;153:B437. Dutch.

DE LEON J, STANILLA JK, WHITE AO, et al: *Anticholinergics to treat clozapine withdrawal*. J Clin Psychiatry, 1994; 55: 119-120.

DE LEON J: *Atypical antipsychotic dosing: the effect of smoking and caffeine*. Psychiatr Serv, 2004; 55: 491-3.

DE LEON J, et al: *Clinical Guidelines for Psychiatrists for the use of Pharmacogenetics Testing for CYP450 2D6 and CYP450 2C19*. Psychosomatics, 2006; 47: 75-85.

DE LEON J, et al: *Weight gain during a double-blind multidosage clozapine study*. J. Clin. Psychopharmacol., 2007; 27: 22-7.

DE LEON J, SANTORO V, D'ARRIGO G, SPINA E: *Interactions between antiepileptics and second generations antipsychotics*. [Expert Opin Drug Metab Toxicol](#). 2012 Mar;8(3):311-34. Epub 2012 Feb 15.

DEMLER TL, TRIGOBOFF E: *Are clozapine blood dyscrasias associated with concomitant medications?*. Innov Clin Neurosci. 2011 Apr;8(4):35-41.

DEQUADRO JM, ROBERTS M: *Elevated clozapine levels after fluvoxamine inhibition*. Am J Psychiatry, 1996; 153: 840-841.

DEVINSKY O, HONIGFELD G, PATIN J: *Clozapine-related seizures*. Neurology, 1991; 41: 369-371.

DREYFUSS P, VOGEL D, WALSH N: *The use of transdermal scopolamine to control drooling. A case report*. Am J Phys Med Rehabil, 1991; 70(4): 220-2.

DULUCQ S, BOUCHET S, TURCQ B, LIPPERT E, ETIENNE G, REIFFERS J, MOLIMARD M, KRAJINOVIC M, MAHON FX: *Multidrug resistance gene (MDR1) polymorphisms are associated with major molecular responses to standards-dose imatinib in chronic myeloid leukemia*. Blood. 2008, 112:2024-7.

DUMORTIER G, LOCHU A, COLEN DE MELO P, et al: *Elevated clozapine plasma concentration after fluvoxamine initiation*. Am J Psychiatry, 1996; 153: 738-789.

DURIF F, DEBILLY B, GALITZKI M et al.: *Clozapine improves dyskinesias in Parkinson disease: a double blind, placebo controlled study*. Neurology. 2004 Feb 10;62(3):381-8.

EAP CHIN B, BENDER S, JAQUENOUD SE, CUCCHIAG, JONZIER-PEREY M, BAUMANN P, et al: *Nonresponse to clozapine and ultrarapid CYP1A2 activity: clinical data and analysis of CYP1A2 gene*. J Clin Psychopharmacol, 2004; 24(2): 214-9.

EICHELBAUM M, INGELMAN-SUNDBERG M, EVANS WE: *Pharmacogenomics and individualized drug therapy*. Annu. Rev. Med., 2006; 57, 119-37.

EIERMAN B, ENGEL G, JOHANSSON I, et al: *The involvement of CYP1A2 and CYP3A4 in the metabolism of clozapine*. Br J Clin Pharmacol, 1997; 44: 439-446.

ELOMAA E: *The secret of clozapine: to sleep while awake?*. Med Hypoth, 1994; 43: 245-246.

ESPNES KA; HEIMDAL KO; SPIGSET O: *A puzzling case of increased serum clozapine levels in a patient with inflammation and infection*. [Ther Drug Monit](#). 2012 Oct;34(5):489-92.

EVANS WE, RELLING MV: *Pharmacogenomics: translating functional genomics in rational therapeutics*. Science, 1999; 286: 487-91.

EVANS WE, JOHNSON JA: *Pharmacogenomics: the inherited basis for interindividual differences in drug response*. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet., 2001; 2: 9-39.

FABER MS, FUHR U: *Time response of CYP1A2 activity on cessation of heavy smoking*. Clin Pharmacol Therap, 2004; 76: 178-184.

FABER MS, JETTER A, FUHR U: *Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2005; 97: 125-134.

FABRAZZO M, LA PIA S, MONTELEONE P, et al: *Fluvoxamine increases plasma and urinary levels of clozapine and its major metabolites in a time- and dose-dependent manner*. J Clin Psychopharmacol, 2000; 20: 708-710.

FACCIOLÁ G, AVENOSO A, SPINA E, et al: *Inducing effect of phenobarbital on clozapine metabolism in patients with chronic schizophrenia*. Ther Drug Monit, 1998; 20: 89-93.

FAKRA E, AZORIN JM: *Clozapine for the treatment of schizophrenia*. Expert Opin Pharmacother. 2012 Jul 18.

FERRARI M, BOLLA E, BORTOLASO P, CALLEGARI C, et al.: *Association between CYP1A2 polymorphisms and clozapine-induced adverse reactions in patients with schizophrenia*. Psychiatry Res. 2012 Aug 16.

FIGUREDÓ VM: *Chemical cardiomyopathies: the negative effects of medications and nonprescribed drugs on the heart*. Am J Med. 2011 Jun;124(6):480-8. Review.

FITTON A, HEEL RC: *Focus on clozapine*. Drugs, 1990; 40: 722-747.

FLANAGAN RJ, BALL RY: *Gastrointestinal hypomotility: an under-recognised life-threatening adverse effect of clozapine*. Forensic Sci Int. 2011 Mar 20;206(1-3):e31-6. Epub 2010 Aug 16.

FOUSSIAS G, REMINGTON G. *Antipsychotics and schizophrenia: from efficacy and effectiveness to clinical decision-making*. Can J Psychiatry. 2010 Mar; 55(3): 117-25.

FREEMAN DJ, OYEWUMI LK: *Will routine therapeutic drug monitoring have a place in clozapine therapy?* Clin Pharmacokinet, 1997; 32: 93-100.

FRICK A, KOPITZ J, BERGEMANN N: *Omeprazole reduces clozapine plasma concentrations. A case report*. Pharmacopsychiatry, 2003; 36: 121-123.

FROMM MF: *Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers*. Trends Pharmacol Sci. 2004; 25:423.

FRYE MA, KETTER TA, ALTSHULER LL, et al: *Clozapine in bipolar disorder: treatment implications for other atypical antipsychotics*. J Affect Disord, 1998; 48: 91-104.

FUHR U, ANDERS EM, MAHR G, et al: *Inhibitory potency of quinolone antibacterial agents against cytochrome P4501A2 in vivo and in vitro*. Antimicrob Agents Chemother, 1992; 36: 942-948.

FUHR U, ROST KL: *Simple and reliable CYP1A2 phenotyping by the paraxanthine/caffeine ratio in plasma and in saliva*. Pharmacogenetics, 1994; 4(3): 109-16.

FUNDERBURG LG, VERTRESS JE, TRUE JE, et al: *Seizure following addition of erythromycin to clozapine treatment*. Am J Psychiatry, 1994; 151: 1840-1841.

GABBAY O'DOWD MA, MAMAMTAVRISHVILI M, ASNIS GM: *Clozapine and oral contraceptives: a possible drug interaction*. J Clin Psychopharmacol, 2002; 22: 621-2.

GEIBIG CB, MARKS LW: *Treatment of clozapine - and molindone - induced agranulocytosis with granulocyte colony- stimulating factor*. Ann Pharmacother, 1993; 27: 1190-1192.

GERSON SL, LIEBERMAN JA, FRIEDENBERG WR, LEE D, MARKX JJ JR, MELTZER H: *Polypharmacy in fatal clozapine-associated agranulocytosis*. Lancet, 1991; 338: 262-263.

GERSON SL, MELTZER H: *Mechanisms of clozapine-induced agranulocytosis*. Drug Safety, 1992; 7 (suppl. 1): 17-25.

GLICK ID, CORRELL CU, ALTAMURA AC, et al.: *Mid-term and long-term efficacy and effectiveness of antipsychotic medications for schizophrenia: a data-driven, personalized clinical approach*. J Clin Psychiatry. 2011 Dec.

GOLDMAN MB: *The assessment and treatment of water imbalance in patients with psychosis*. Clin Schizophr Relat Psychoses. 2010 Jul; 4(2): 115-23.

GREEN AI, TOHEN M, PATEL JK, et al: *Clozapine in the treatment of refractory psychotic mania*. Am J Psych, 2000; 157: 982-986.

GREENBLATT DJ, VON MOLTKE LL, SCHMIDER J, HARMATZ JS, SHADER RI: *Inhibition of human cytochrome P450-3A isoforms by fluoxetine and norfluoxetine in vitro and in vivo studies*. J Clin Pharmacol, 1996; 36: 792-8.

GUDELSKY GA, NASH JF, KOENIG JI, et al: *Neuroendocrine effects of typical and atypical antipsychotics in the rat*. Psychopharmacol Bull, 1987; 23: 483-486.

GUESSOUS I, DOBRINAS M, KUTALIK Z, et al.: *Caffeine intake, and CYP1A2 variants associated with high caffeine intake, protect non-smokers from hypertension*. Hum Mol Genet. 2012 Apr 5.

GUPTA M: *Clozapine and co-prescribed psychotropics: a short report*. Clinical Practice and Epidemiology in Mental Health 2008, 4:11 doi:10.1186/1745-0179-4-11

HADUCH A, BROMECK E, DANIELWA: *The effect of psychotropic drugs on cytochrome P450 2D (CYP2D) in rat brain*. [Eur J Pharmacol](#). 2011 Jan 25;651(1-3):51-8. Epub 2010 Nov 27.

HAGG S, SPIGSET O, MJORNDAL T, et al: *Absence of interaction between erythromycin and a single dose of clozapine*. Eur J Clin Pharmacol, 1999; 55: 221-226.

HAGG S, SPIGSET O, MJORNDAL T, et al: *Effect of caffeine on clozapine pharmacokinetics in healthy volunteers*. Br J Clin Pharmacol, 2000; 49: 59-63.

HAHN MK, REMINGTON G, BOIS D, COHN T: *Topiramate augmentation in clozapine-treated patients with schizophrenia: clinical and metabolic effects*. J Clin Psychopharmacol. 2010 Dec; 30(6): 706-10.

HALPER JR: *Structural basis of selective cytochrome P450 inhibition*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1995; 35: 29-53 (*Complementary properties of isoform-selective P450 inhibitors and their target enzymes determine inhibitors selectivity*).

HAMDY SI, HIRATSUKA M, NARAHARA K, ENDO N, EL-ENANY M, MOURSI N, AHMED MS, MIZUGAKI M: *Genotyping of four genetic polymorphisms in the CYP1A2 gene in the Egyptian population*. Br J Clin Pharmacol, 2003; 55(3): 321-4.

HAN XM, CHEN XP, WU QN, JIANG CH, ZHOU HH: *G-2964A and C-734A genetic polymorphisms of CYP1A2 in Chinese population*. Acta Pharmacol Sin, 2000; 21: 1031-1034.

HAN XM, OU-YANG DS, LU PX, JIANG CH, SHU Y, CHENG XP, TAN ZR, ZHOU HH: *Plasma caffeine metabolite ratio (17X /137X) in vivo associated with G-2964A and C-734A polymorphisms of human CYP1A2*. Pharmacogenetics, 2001; 11: 429-435.

HARRISON-WOOLRYCH M, SKEGG K, ASHTON J, HERBISON P, SKEGG DC: *Nocturnal enuresis in patients taking **clozapine**, risperidone, olanzapine and quetiapine: comparative cohort study*. Br J Psychiatry. 2011 Jun 8.

HARTLING L, ABOU-SETTA AM, DURSUN S, MOUSAVI SS, PASICHNYK D, NEWTON AS.: *antipsychotics in adults with schizophrenia: comparative effectiveness of first-generation versus second-generation medications: a systematic review and meta-analysis*. Ann intern med. 2012 aug 14. Doi: 10.7326/0003-4819-157-7-201210020-00525.

HASEGAWA M, GUTIERREZ-ESTEINOU R, WAY L, MELTZER HY: *Relationship between clinical efficacy and clozapine concentrations in plasma in schizophrenia: effect of smoking*. J Clin Psychopharmacol, 1993; 13: 383-390.

HASNAIN M, W VICTOR RV, HOLLETT B.: *Weight gain and glucose dysregulation with second-generation antipsychotics and antidepressants: a review for primary care physicians*. Postgrad Med. 2012 Jul;124(4):154-67.

HERMES E, ROSENHECK R: *Choice of randomization to clozapine versus other second generation antipsychotics in the CATIE schizophrenia trial*. J Psychopharmacol. 2012 Apr 19.

HIEMKE C, WEIGHMANN H, HARTTER S, et al: *Elevated serum levels of clozapine after addition of fluvoxamine*. J Clin Psychopharmacol, 1994; 14: 279-281.

HIMMERICH H, SCHONERR J, FULDA S, SHELDRIK AJ, BAUER K, SACK U: *Impact of antipsychotics on cytokine production in-vitro*. J Psychiatr Res. 2011 May 16. [Epub ahead of print]

HIPPIUS H: *The history of clozapine*. Psychopharmacol, 1989; 99: 53-55.

HOFFMEYERS, et al.: *Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo*. Proc Natl. Acad Sci. U.S.A., 2000; 97: 3473-78.

HONIGFELD G: *Effects of the clozapine national registry system on incidence of deaths related to agranulocytosis*. Psychiatr Serv, 1996; 47: 52-56.

HOWANITZ E, PARDO M, SMELSON DA, et al: *The efficacy and safety of clozapine versus chlorpromazine in geriatric schizophrenia*. J Clin Psych, 1999; 60(1): 41-44.

HUMMER M, KEMMLER G, KURZ M, KURZTHALER I, OBERBAUER H, FLEISCHHACKER WW: *Weight gain induced by clozapine*. Eur Neropsychopharmacol, 1995; 5(4): 437-40.

HUNTER R, GAUGHAN T, QUEIRAZZA F, McMILLAN D, SHANKIE S: *Clozapine-induced interstitial nephritis- a rare but important complication: a case report*. J Med Case Reports. 2009 Aug 27;3:8574.

HWANG R, et al: *Association study of 12 polymorphisms spanning the dopamine D(2) receptor gene and clozapine treatment response in two treatment refractory/intolerant populations*. Psychopharmacology, 2005; 181: 179-87.

HWANG R, et al: *Effect of dopamine D3 receptor gene polymorphisms and clozapine treatment response: exploratory analysis of nine polymorphisms and meta-analysis of the Ser9Gly variant*. Pharmacogenomics J. 2010 Jun; 10(3): 200-18. Epub 2009 Dec 22.

INGELMAN-SUNDBERG M: *Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future*. Trends Pharmacol Sci, 2004; 25: 193-200.

INGELMAN-SUNDBERG M, SIM SC, GOMEZ A, RODRIGUEZ-ANTONA C: *Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoepigenetic and clinical aspects*. Pharmacol Ther. 2007 Dec; 116(3): 496-526. Epub 2007 Oct 9.

ISMAIL Z, WESSLES AM, UCHIDA H, MAMO DC, RAIJI TK, POLLOCK BG, MULSANT BH, BIES RR: *Age and sex impact clozapine plasma concentrations inpatients and outpatients with schizophrenia*. Am J Geriatr Psychiatry. 2011 Mar 17.

JAISWAL AK, NEBERT DW, McBRIDE OW, GONZALEZ FJ: *Human P3450: cDNA and complete protein sequence, repetitive alu sequences in the 3' nontranslated region, and localization of gene to chromosome 15*. J. Exp. Pathol., 1987; 3, 1-17.

JANN MW, GRIMSTEY SR, GRAY EC, et al: *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine*. Clin Pharmacokinet, 1993; 24: 161-176.

JAQUENOUD SIROT E, et al.: *ABCB1 and cytochrome P450 polymorphisms : clinical pharmacogenetics of clozapine*. J Clin Psychopharmacol. 2009 Aug; 29(4): 319-26.

JERLING M, LINDSTROM L, BONDESSON, et al: *Fluvoxamine inhibition and carbamazepine induction of the metabolism of clozapine: evidence from a therapeutic drug monitoring service*. Ther Drug Monit, 1994; 16: 368-374.

JOOPER R, BOKSA P: *Clozapine: a distinct, poorly understood and under-used molecule*. J Psychiatry Neurosci. 2010 May; 35(3): 147-9.

JOOS AAB, FRANK UG, KASCHKA WP: *Pharmacokinetic interaction of clozapine and rifampicin in a forensic patient with an atypical mycobacterial infection*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 83-85.

JUNGHAN U, ALBERS M, WOGGON B: *Increased risk of hematological side-effect in psychiatric patients treated with clozapine and carbamazepine*. Pharmacopsychiatry, 1993; 26: 262.

KAJINAMI K, TAKEKOSHI N, BROUSSEAU ME, SCHAEFER EJ: *Pharmacogenetics of HMG-CoA reductase inhibitors: exploring the potential for genotype-based individualization of coronary heart disease management*. Atherosclerosis. 2004 Dec; 177(2): 219-34.

KALOW W, TANG BK: *Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities*. Clin Pharmacol Ther, 1991; 50(5 Pt 1): 508-19.

KALOW W, TANG BK, ENDRENYI L: *Hypothesis: comparison of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research*. Pharmacogenetics, 1998; 8: 283-9.

KAMPHUIS H, ARENDS J, TIMMERMAN L, VAN MARLE J, KAPPERT J: *Myocarditis and cardiomyopathy: underestimated complications resulting from clozapine therapy*. Tijdschr Psychiatr. 2010;52(4):223-33. Review. Dutch.

KANE JM, COOPER TB, SACHER EJ, et al: *Clozapine: plasma levels and prolaction response*. Psychopharmacology, 1981; 73: 184-187.

KANE JM: *Clinical efficacy of clozapine in treatment-refractory schizophrenia: an overview*. Br J Psychiatry, 1992; 17(suppl): 41-45.

KANE JM: *Schizophrenia*. N Engl J Med, 1996; 334: 34-41.

KANE JM, CORRELL CU: *Pharmacologic treatment of schizophrenia*. Dialogues Clin Neurosci. 2010; 12(3): 345-57.

KANEDA Y, JAYATHILAK K, MELTZER H: *Determinants of work outcome in neuroleptic-resistant schizophrenia and schizoaffective disorder: cognitive impairment and clozapine treatment*. Psychiatry Res. 2010 Jun 30; 178(1): 57-62. Epub 2010 May 8.

KAO SL, CHONG SS, LEE CG: *The role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in understanding complex disorders and pharmacogenomics*. Ann Acad Med Singapore, 2000; 29(3): 376-82.

KAY SR, FISZBEIN A, OPLER LA: *The positive and negative syndrome scale (PANSS) for schizophrenia*. Schizophr Bull. 1987; 13(2): 261-76.

KELLY DK, et al: *Clozapine utilization and outcomes by race in a public mental health system: 1994-2000*. J. Clin. Psychiatry, 2006; 67: 1404-11.

KERWIN RW: *Adverse reactions reporting and new antipsychotics*. Lancet, 1993; 342: 1440.

KESSING LV, THOMSEN AF, MOGENSEN UB, ANDERSEN PK. *Treatment with antipsychotics and the risk of diabetes in clinical practice*. Br J Psychiatry. 2010 Oct; 197(4): 266-71.

KHAN AY, PRESKORN SH: *Examining concentration-dependence toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring*. J Psychiatr Pract, 2005; 11: 289-301.

KITZMILLER J, GROEN D, PHELPS M, SADEE W: *Pharmacogenomic testing:relevance in medical practice. Why drugs work in some patients but not in others*. Cleve Clin J Med. 2011 April ; 78(4): 243–257. doi:10.3949/ccjm.78a.1014.

KLIMKE A, KLIESER E: *Sudden death after intravenous application of lorazepam in a patient treated with clozapine*. Am J Psychiatry, 1994; 151: 780.

KOHLRAUSCH FB, et al: *G-protein gene 825C>T polymorphism is associated with response to clozapine in Brazilian schizophrenics*. Pharmacogenomics, 2008; 9 (10): 1429-36.

KOHLRAUSCH FB, SALATINO-OLIVEIRA A, GAMA CS, LOBATO MI, BELMONTE-DE-ABREU P, HUTZ MH: *Influence of serotonin transporter gene polymorphisms on clozapine response in Brazilian schizophrenics*. J Psychiatr Res. 2010 Dec; 44(16): 1158-62. Epub 2010 May 10.

KOPONEN HJ, LEINONEN E, LEPOLA U: *Fluvoxamine increases the clozapine serum levels significantly*. Eur Neuropsychopharmacol, 1996; 6(1): 69-71.

KROKEN RA, JOHNSEN E.: *Is Rational Antipsychotic Polytherapy Feasible? A Selective Review*. Curr Psychiatry Rep. 2012 Mar 14.

KRUPP P, DEV VJ: *Clozapine/Leponex-induced agranulocytosis – The use of hematopoietic growth factors*. Neuropsychopharmacology, 1994; 10 (3S/pt 2): 267S (abs P-174-220).

KUMAR S, GoSWAMI U, BEHERA D, et al.: *ECT and Clozapine combination producing delirium : A Case Report*. Indian Journal of Psychiatry, 2003, 45 (III) , 193-193.

KUMLIEN E, LUNDBERG PO. *Seizure risk associated with neuroactive drugs: data from the WHO adverse drug reactions database*. Seizure. 2010 Mar; 19(2): 69-73. Epub 2009 Dec 24.

KUMRA S, FRAIZER JA, JACOBSEN LK, et al: *Childhood-onset schizophrenia. A double-blind clozapine-haloperidol comparison*. Arch Gen Psych, 1996; 53(12): 1090-1097.

KUO FJ, LANE HY, CHANG WH: *Extrapyramidal symptoms after addition of fluvoxamine to clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 483-4.

LADER M: *Experience with clozapine in the United Kingdom*. Presented at the NIMH New Clinical Drug Evaluation Unit Program 31st Annual Meeting. Key Biscayne, Florida, May 28-31, 1991.

LAMBERTENGHI DELILIERIS G: *Fisiopatologia e clinica dell'agranulocitosi: ruolo dei farmaci antipsicotici*. BMJ, 1993; 88(suppl): 1-8.

LAMMERS CH, DEUSCHLE M, WEIGMANN H, et al: *Coadministration of clozapine and fluvoxamine in psychotic patients: clinical experience*. Pharmacopsychiatry, 1999; 2: 76-77.

LATIF Z, MALIK MA, JABBAR F, AHMED Y, MCDONOUGH C: *Clozapine-induced late leukopenia*. Ir J Med Sci. 2010 Sep 26. [Epub ahead of print]

LEE TY, CHUNG MY, CHUNG HK, et al.: *Bone Density in Chronic Schizophrenia with Long-Term Antipsychotic Treatment: Preliminary Study*. DOI 10.4306/pi.2010.7.4.278; Print ISSN 1738-3684 / On-line ISSN 1976-3026.

LEE ST, RYU S, KIM SR, et al.: *Association Study of 27 Annotated Genes for Clozapine Pharmacogenetics: Validation of Preexisting Studies and Identification of a New Candidate Gene, ABCB1, for Treatment Response*. J Clin Psychopharmacol. 2012 Jun 19.

LEUCHT S, et al.: *What does the PANSS means?*. Schizophrenia Research. 2005; 79: 231-238.

LEWIS DF, LAKE BG, DICKINS M: *Substrates of human cytochromes P450 from families CYP1 and CYP2: analysis of enzyme selectivity and metabolism*. Drug Metabol Drug Interact, 2004; 20(3): 111-42.

LIEBERMAN JA, JOHNS C, KANE JM, et al: *Clozapine-induced agranulocytosis: Non-cross reactivity with other psychotropic drugs*. J Clin Psychiatry, 1988; 49: 271-277.

LIEBERMAN JA, KANE JM, JOHNS CA: *Clozapine: guidelines for clinical management*. J Clin Psychiatry, 1989; 50: 329-338.

LIEBERMAN JA, SAFFERMAN AZ: *Clinical profile of clozapine: adverse reactions and agranulocytosis*. Psychiatr Q, 1992; 62: 51-70.

LIN JH, LU AYH: *Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications*. Clin Pharmacokinet, 1998; 35: 361-90.

- LLORCA PM, LANCON C, et al.: *Effectiveness of clozapine in neuroleptic-resistant schizophrenia: clinica response and plasma concentrations*. J Psychiatry Neurosci. 2002 Jan; 27 (1): 30-7.
- LUBMAN DI, KING JA, CASTLE DJ. *Treating comorbid substance use disorders in schizophrenia*. Int Rev Psychiatry. 2010; 22(2): 191-201.
- MACCAL C, BILLCLIFF N, IGBRUDE W, NATYNCZUK S, SPENCER EP, FLANAGAN RJ.: *Clozapine: more than 900 mg/die may be needed*. J Psychopharmacol. 2009 Mar;23(2):206-10. Epub 2008 May 30.
- MAHER AR, THEODORE G: *Summary of the comparative effectiveness review on off-label use of atypical antipsychotics*. J Manag Care Pharm. 2012 Jun;18(5 Suppl B):1-20.
- MAHLI G, ADAMS D, PLAIN J, COULSTON C, HERMAN M, WALTER G: *Clozapine and cardiometabolic health in chronic schizophrenia: correlations and consequences in a clinical context*. Australas Psychiatry. 2010 Feb;18(1):32-41.
- MALTESEN HR, LUBLIN HK: *Problems when switching antipsychotics*. Ugeskr Laeger. 2012 Jan 30;174(5):264-7.
- MARANO G, TRAVERSI G, ROMAGNOLO E, et al.: *Cardiologic side effects os pshychotropic drugs*. Journal of Geriatric Cardiology (2011) 8: 243–253.
- MARKOWITZ JS, JACKSON CW: *Use of clozapine with nonresponsive patients*. Psychiatr Serv, 1996; 47(12) : 1392.
- MATSUDA KT, et al: *Clozapine dosage, serum levels, efficacy, and side-effect profiles: a comparison of Korean-American and Caucasian patients*. Psychopharmacol. Bull., 1996; 32: 253-7.
- MATTAI AK, HILL JL, LENROOT RK: *Treatment of early-onset schizophrenia*. Curr Opin Psychiatry. 2010 Jul; 23(4): 304-10.
- MCCARTHY R: *Seizure following smoking cessation in a clozapine responder*. Pharmacopsychiatry, 1994; 27: 210-1.
- McGINNITY DF, BERRY AJ, KENNY JR, GRIME K, RILEY RJ: *Evaluation of time-dependent cytochrome P450 inhibition using cultured human hepatocytes*. Drug Metab Dispos, 2006; 34: 1291-300.
- McKINNON ND, AZAD A, WATERS BM, JOSHI KG: *Clozapine-induced Bowel Infarction: a case report*. Psychiatry (Edgmont), 2009; 6(3):30-35.
- McKORMICK PN, KAPUR S, GRAFF-GUERRERO A, et al.: *The Antipsychotics olanzapine, Risperidone, Clozapine, and Haloperidol Are D2-Selective Ex Vivo but Not In Vitro*. Neuropsychopharmacology (2010) 35, 1826–1835.
- MELTZER HY, GOODE DJ, SCHYVE PM, et al: *Effect of clozapine on human serum prolactin levels*. Am J Psychiatry, 1979; 136: 1550-1555.

MELTZER HY: *Update on typical and atypical antipsychotics drugs*. Annu Rev Med. 2012 Sep 27.

MELTZER HY: *Clinical studies on the mechanisms of action of clozapine: the dopamineserotonin hypothesis of schizophrenia*. Psychopharmacology, 1989; 99: S18-S27.

MELTZER HY: *Clozapine: mechanism of action in relation to its clinical advantages*. In KALES A, STEFANIS CN, TALBOTT JA, eds.: *Recent advances in schizophrenia*. New York, Springer-Verlag, 1990; 237-24.

MELTZER HY: *Role of serotonin in the action of atypical antipsychotic drugs*. Clin Neurosci, 1995; 3: 64-75.

MELTZER HY, BOBO WV, LEE MA, COLA P, JAYATHILAKE K. *A randomized trial comparing clozapine and typical neuroleptic drugs in non-treatment-resistant schizophrenia*. Psychiatry Res. 2010 May 30; 177(3): 286-93. Epub 2010 Apr 8.

MELTZER HY, MASSEY BW, HORIGUCHI M.: *Serotonin Receptors as Targets for Drugs Useful to Treat Psychosis and Cognitive Impairment in Schizophrenia*. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Jan 26.

MEYER JM: *Individual changes in clozapine levels after smoking cessation: results and a predictive model*. J Clin Psychopharmacol, 2001; 21: 569-74.

MILLER DD: *Effect of phenytoin on plasma clozapine concentrations in two patients*. J Clin Psychiatry, 1991; 52: 23-35.

MILLER D: *The clinical use of clozapine plasma concentration in the management of treatment-refractory schizophrenia*. Annals of Clinical Psychiatry, 1996; 8:99-109.

MÖLLER HJ. *Pharmacotherapy of schizophrenic patients: Achievements, unsolved needs, future research necessities*. Curr Pharm Biotechnol. 2012 Jan 26.

MONTASTRUC G, FAVRELIERE S, SOMMET A, et al.: *Drugs and dilated cardiomyopathies: A case/noncase study in the French Pharmacovigilance Database*. Br J Clin Pharmacol. 2010 Mar; 69(3): 287-94.

MOOKHOEK EJ, LOONEN AJ: *Retrospective evaluation of the effect of omeprazole on clozapine metabolism*. Pharm World Scie, 2004; 26: 180-182.

MOTULSKY AG: *Pharmacogenetics*. Prog Med Genet, 1964; 23: 49-74.

MUELLER T, BECKER T, FRITZE J: *Neuroleptic malignant syndrome after clozapine plus carbamazepine*. Lancet, 1998; 2: 1500.

MURRAY M: *Role of CYP pharmacogenetics and drug-drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents*. J Pharm Pharmacol, 2006; 58: 871-875.

MUSSER WS, WILLS CD, NIMGAONKAR VL: *Is there rapid relapse after discontinuation of clozapine?* Biol Psychiatry, 1994; 35:742 (abs 459).

MYAMOTO S, MAYAKE N, JARSKOG LF, et al.: *Pharmacological treatment of schizophrenia: a critical review of the pharmacology and clinical effects of current and future therapeutic agents.* Mol Psychiatry. 2012 May 15. doi: 10.1038/mp.2012.47.

NABER D, HOLZBACH R, PERRO C, et al: *Clinical management of clozapine patients in relation to efficacy and side-effects.* Br J Psychiatry, 1992; 160: 54-59.

NAKAJIMA M, YOKOI T, MIZUTANI M, KINOSHITA M, FUNAYAMA M, KAMATAKI T: *Genetic polymorphism in the 5' -flanking region of human CYP1A2 gene: effect on the CYP1A2 inducibility in humans.* J Biochem, 1999; 125: 803–808.

NG CH, et al: *The emerging role of pharmacogenetics: implications for clinical psychiatry.* Aust. N. Z. J. Psychiatry, 2004; 38: 483-9.

NG CH, et al: *An inter-ethnic comparison study of clozapine dosage, clinical response and plasma levels.* Int. Clin. Psychopharmacol., 2005; 20: 163-8.

NIELSEN H: *Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF;filgrastim) treatment of clozapine-induced agranulocytosis.* J Int Med, 1993; 234: 529-531.

NIELSEN J, MEYER JM: *Risk Factors for Ileus in Patients with Schizophrenia.* Schizophr Bull. 2010 Nov 26. [Epub ahead of print]

NIELSEN J, RØGE R, SCHJERNING O, SØRENSEN HJ, TAYLOR D: *Geographical and temporal variations in clozapine prescription for schizophrenia.* Eur Neuropsychopharmacol. 2012 Apr 13.

NONGPIUR A, PRAHARAJ SK, SARKAR S, DAS B: *Delayed Onset of Clozapine-Induced Leucopenia.* Am J Ther. 2010 Aug 19. [Epub ahead of print]

NOSÈ M, ACCORDINI S, ARTIOLI P, et al: *Rationale and design of an independent controlled trial evaluating the effectiveness of aripiprazole or haloperidol in combination with clozapine for treatment-resistant schizophrenia.* Trials 2009, 10:31; doi:10.1186/1745-6215-10-31.

NYAKYOMA K, MORRISS R: *Effectiveness of Clozapine use in Delaying Hospitalization in Routine Clinical Practice: A 2 year Observational Study.* Psychopharmacol Bull. 2010; 43(2): 67-81.

OKEY AB: *Enzyme induction in the cytochrome P450 system.* Pharmacol Ther, 1990; 45(2): 241-98.

OLESEN OV, STARUP G, LINNET K: *Serious drug interaction between clozapine-Leponex and fluvoxamine-Fevarin.* Ugeskr. Lager, 1996; 158: 6931-6932.

- OLESEN OV, LINNET K: *Fluvoxamine-clozapine drug interaction: inhibition in vitro of five cytochrome P450 isoforms involved in clozapine metabolism*. J Clin Psychopharmacol, 2000; 20: 35-42.
- OLESEN OV, LINNET K: *Contributions of five human cytochrome P450 isoforms to the N-demethylation of clozapine in vitro at low and high concentrations*. J Clin Pharmacol, 2001; 41: 823-832.
- OREN R, GRANAT E, SHRTRUSSBERG S, MATZNER Y: *Clozapine-induced agranulocytosis treated with granulocyte macrophage colony stimulating factor*. Br J Psychiatry, 1993; 162: 686-687.
- ORTIZ DE MONTELLANO PR: *The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibitor of cytochrome P450*. Drug Metab Dispos, 1995; 23(11): 1181-7.
- OVERALL JE, GORHAM DR: *The Brief Psychiatric Rating Scale*. Psychological Reports, 1962; 10: 790-812.
- ÖZDEMİR V, KALOW W, POSNER P, COLLINS EJ, KENNEDY JL, TANG BK, ALBERS LJ, REIST C, ROY R, WALKERS W, AFRA P: *CYP1A2 activity as measured by a caffeine test predicts clozapine and active metabolite steady-state concentration in patients with schizophrenia*. J Clin Psychopharmacol, 2001; 21(4): 398-407.
- PALIA SS, CLARKE EJ: *Clozaril withdrawal syndrome*. Psychiatr Bull, 1993; 17: 374-375.
- PANARIELLO F, PERRUOLO G, CASSESE A, GIACCO F, BOTTA G, BARBAGALLO AP, MUSCETTOLA G, BEGUINOT F, FORMISANO P, DE BARTOLOMEIS A: *Clozapine impairs insulin action by up-regulating Akt phosphorylation and Ped/Pea-15 protein abundance*. J Cell Physiol. 2011 May 26. doi: 10.1002/jcp.22864. [Epub ahead of print]
- PANCHERI P: *Farmacoterapia psichiatrica*. Masson, 2003.
- PAPETTI F, MOREL-PINGAUL V, BUISSE V, MAZIERE L, BANAYAN M, THAUBY S, BESNARD T, DAR COURT G, PRINGUEY D: *Clozapine-resistant schizophrenia related to an increased metabolism and benefit of fluvoxamine: four case report*. Encephale, 2007; 33(5): 811-8.
- PAULI-MAGNUS C, KROETZ DL: *Functional implications of genetic polymorphisms in the multidrug resistance gene MDRI (ABCB1)*. Pharm Res, 2004; 21: 904-913, gene expression. Science. 2003; 301: 792-802.
- PERERA V, GROSS AS, McLACHLAN AJ: *Measurement of CYP1A2 Activity: A Focus on Caffeine as a Probe*. Curr Drug Metab. 2012 Apr 30.

PERRY PJ, MILLER DD, ARNDT SV, CADORET RJ: *Clozapine and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients*. Am J Psychiatry, 1991; 148: 231-235.

PHILPOT RM: *Characterization of cytochrome P450 in extrahepatic tissues*. Methods Enzymol, 1991; 206: 623-31.

PICCINELLI M, PINI S: *Le scale di valutazione in psicofarmacologia clinica*, a cura di Bellantuono C, Balestrieri M, *Gli psicofarmaci: farmacologia e terapia*. Il Pensiero Scientifico Editore, Roma, 1997, pp. 71-110.

PIERELLI F, ADIPIETRO A, SOLDATI G, et al.: *Low dosage clozapine effects on L-Dopa induced dyskinesias in Parkinsonian Patients*. Acta Neurol Scand. 1998 May;97(5):295-9.

PINNINTI NR, DE LEON J: *Interaction of sertraline with clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1997; 17: 119-120.

PINTOR L, VALLDEORIOLA F, BAILLÉS E, et al.: *Ziprasidone Versus Clozapine in the Treatment of Psychotic Symptoms in Parkinson Disease: A Randomized Open Clinical Trial*. Clin Neuropharmacol. 2012 Mar 1.

PLOWCHALK DR, ROWLAND YEO K.: *Prediction of drug clearance in a smoking population: modeling the impact of variable cigarette consumption on the induction of CYP1A2*. Eur J Clin Pharmacol. 2012 Jan 19.

POLLAK P, TISON F, et al: *Clozapine in drug induced psychosis in Parkinson's disease: a randomised, placebo controlled study with open follow up*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004; 75: 689-695.

POPE HG, COLE JO, CHOPAS PT: *Apparent neuroleptic malignant syndrome associated with clozapine and lithium*. J Nerv Ment Dis, 1986; 174 : 493-495.

POTKIN SG, BERA R, GULASEKARAM B, et al: *Plasma clozapine concentrations predict clinical response in treatment-resistant schizophrenia*. J Clin Psychiatry, 1994; 55: 133-136.

PRICE SA, BRHAM NC: *Antipsychotic treatment of adolescent dual diagnosis patients*. J Pediatr Pharmacol Ther. 2011 Oct;16(4):226-36.

PRAHARAJ SK: *Tardive dyskinesia with clozapine dose reduction or withdrawal dyskinesia?* Indian J Pharmacol. 2011 Feb;43(1):93.

PRAHARAJ SK, JANA AK, GOSWAMI K, DAS PR, GOYAL N, SINHA VK: *Salivary flow rate in patients with schizophrenia on clozapine*. Clin Neuropharmacol. 2010 Jul;33(4):176-8.

PRAMYOTHIN P, KHAODHIAR L. *Metabolic syndrome with the atypical antipsychotics*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes. 2010 Oct; 17(5): 460-6.

- PRIOR TI, CHUE PS, TIBBO P, BAKER GR: *Drug metabolism and atypical antipsychotics*. Eur Neuropsychopharmacol, 1999; 9: 301-309.
- QUARTESAN R, ALBRIGO D, CAPORALI B, FERRINI R: *Citocromo P450. Interazioni farmacologiche*. CIC, Edizioni Internazionali – Roma, 2002.
- RAASKA K, NEUVONEN PJ: *Ciprofloxacin increases serum clozapine and N-desmethylozapine: a study in patients with schizophrenia*. Eur J Clin Pharmacol, 2000; 56(8): 585-9.
- RAGGI MA, MANDRIOLI R, SABBIONI C, et al: *Atypical antipsychotics: pharmacokinetics, therapeutic drug monitoring and pharmacological implications*. Curr Med Chem, 2004; 11: 279-296.
- RAKESH K, SPENCER K, LYNN, DEMARCO S, et al: *Behavioural effects of clozapine: involvement of trace amine pathways in C. elegans and M. musculus*. Brain Res. 2011 June 1; 1393: 91–99. doi:10.1016/j.brainres.2011.04.010.
- REINACH B, DE SOUSA G, DOSTERT P, et al: *Comparative effects of rifabutin and rifampicin on cytochromes P450 and UDP- glucuronosyl-transferases expression in fresh and cryopreserved human hepatocytes*. Chem Biol Interact, 1999; 121: 37-48.
- ROGE R, MOLLER BK, ANDERSEN CR, CORREL CU, NIELSEN J: *Immunomodulatory effects of clozapine and their clinical implications: What have we learned so far?* Schizophr Res. 2012 Jul 23.
- ROUHOS A, RAASKA K: *Smoking and drug interactions*. Duodecim. 2012;128(10):1073-80. Finnish.
- RONALDSON KJ, TAYLOR AJ, FITZGERALD PB, TOPLISS DJ, ELSIK M, MCNEIL JJ: *Diagnostic characteristics of clozapine-induced myocarditis identified by an analysis of 38 cases and 47 controls*. J Clin Psychiatry. 2010 Aug; 71(8): 976-81. Epub 2010 Mar 9.
- ROSENHECK R, LAWSON W, CRAYTON J, et al: *Predictors of differential response to clozapine and haloperidol. Veterans Affairs Cooperative Study Group on Clozapine in Refractory Schizophrenia*. Biol Psych, 1998; 44: 475-482.
- RUMMEL-KLUGE C, KOMOSSA K, SCHWARZ S, HUNGER H, SCHMID F, LOBOS CA, et al.: *Head-to-head comparisons of metabolic side effects of second generation antipsychotics in the treatment of schizophrenia: a systematic review and meta-analysis*. Schizophr Res. 2010 Nov; 123(2-3): 225-33. Epub 2010 Aug 7.
- RYABIK BM, NGUYEN VT, MANN RM, SMITH JD, LIPPMANN SB: *Clozapine-induced agranulocytosis and colony-stimulating cytokines*. Gen Hosp Psychiatry, 1993; 15: 263-265.
- SACHSE C, BROCKMÖLLER J, BAUER S, ROOTS I: *Functional significance of a C-A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine*. Br J Clin Pharmacol, 1999; 47: 445-49.

SACHSE C, BHAMBRA U, SMITH G, LIGHTFOOT TJ, BARRETT JH, SCOLLAY J, et al.: *Polymorphisms in the cytochrome P450 CYP1A2 gene (CYP1A2) in colorectal cancer patients and controls: allele frequencies, linkage disequilibrium and influence on caffeine metabolism*. Br J Clin Pharmacol, 2003; 55: 68–76.

SAFFERMAN AZ, LIEBERMAN JA, KANE JM, et al: *Update on the clinical efficacy and side effects of clozapine*. Schizophr Bull, 1991; 17: 247-258.

SAGUD M, MIHALJEVIĆ-PELES A, MÜCK-SELER D, et al.: *Smoking and schizophrenia*. Psychiatr Danub. 2009 Sep; 21(3): 371-5.

SAUNDERS KE, HAWTON K: *The role of psychopharmacology in suicide prevention*. Epidemiol Psichiatr Soc. 2009 Jul-Sep; 18(3): 172-8.

SCHMAUSS M, WOLFF R, ERFURTH A, RÜTHER E: *Tolerability of long term clozapine treatment*. Psychopharmacology, 1989; 99: S105-S108.

SCHIRMBECK F, ESSLINGER C, RAUSH F, ENGLISCH S, MEYER-LINDENBERG A, ZINK M: *Antiserotonergic antipsychotics are associated with obsessive-compulsive symptoms in schizophrenia*. Psychol Med. 2011 Apr 5:1-13.

SCHMIDER J, GRENBLATT DJ, von MOLTKE LL, KARSOV D, SHADER RI: *Inhibition of CYP2C19 by selective serotonin reuptake inhibitors in vitro: studies of phenytoin p-hydroxylation*. Br J Clin Pharmacol, 1997; 44: 495-8.

SHADER RI, GREENBLATT DJ: *Clozapine and fluvoxamine, a curious complexity*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 101-102.

SHENG-NAN WU, et al: *Association of DRD2 polymorphism and chlorpromazine-induced extrapyramidal syndrome in Chinese schizophrenic patients*. Acta Pharmacologica Sinica, 2006; 27(8): 966-70.

SHIMADA T, YAMAZAKI H, MIMURA M, INUI Y, GUENGERICH FP: *Interindividual variations in human liver cytochrome P450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians*. J Pharmacol Exp Ther, 1994; 270(1): 414-23.

SHIRLEY KL, HON YY, PENZAK SR, LAM YW, SPRATLIN V, JANN MW: *Correlation of cytochrome P450(CYP)1A2 activity using caffeine phenotyping and olanzapine disposition in healthy volunteers*. Neuropharmacology, 2003; 28: 961-966.

SIMPSON GM, VARGA E: *Clozapine: a new antipsychotic agent*. Curr Ther Res, 1974; 16: 679-686.

SOUZA RP, et al. (a): *Influence of neurexin 1 (NRXN1) polymorphisms in clozapine response*. Hum Psychopharmacol. 2010 Sep 22. [Epub ahead of print]

- SOUZA RP, et al. (b): *Influence of serotonin 3A and 3B receptor genes on clozapine treatment response in schizophrenia*. Pharmacogenet Genomics. 2010 Apr; 20(4): 274-6.
- SOUZA RP, et al. (c): *Genetic association of the GDNF alpha-receptor genes with schizophrenia and clozapine response*. J Psychiatr Res. 2010 Aug; 44(11): 700-6. Epub 2010 Jan 29.
- SPINA E, AVENOSO A, FACCIOLÁ G, et al: *Effect of fluoxetine on the plasma concentrations of clozapine and its major metabolites in patients with schizophrenia*. Int Clin Psychopharmacol, 1998; 13: 141-5.
- SPINA E, AVENOSO A, FACCIOLÁ G, SCORDO MG, ANCIONE M, MADIA AG, VENTIMIGLIA A, PERUCCA E: *Relationship between plasma concentrations of clozapine and norclozapine and therapeutic response in patients with schizophrenia resistant to conventional neuroleptics*. Psychopharmacology, 2000; 148: 83-89.
- SPINA E, PERUCCA E: *Clinical significance of pharmacokinetic interactions between antiepileptic and psychotropic drugs*. Epilepsia, 2002; 43 (Suppl 2): 37-44.
- SPINA E, DE LEON J: *Metabolic drug interactions with newer antipsychotics: a comparative review*. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2007; 100: 4-22.
- STAHL S: *Psicofarmacologia essenziale*. Centro Scientifico Ed., 2002.
- STARKSTEIN SB, BROCKMAN S, HAYHOW BD: *Psychiatric syndromes in Parkinson's disease*. Curr Opin Psychiatry. 2012 Sep 18.
- SWIFT R: *Medications acting on the dopaminergic system in the treatment of alcoholic patients*. Curr Pharm Des. 2010; 16(19): 2136-40.
- SZEGEDI A, WIESNER J, HIEMKE C: *Improved efficacy and fewer side effects under clozapine treatment after addition of fluvoxamine*. J Clin Psychopharmacol, 1995; 15: 141-143.
- SZEGEDI A, ANGHELESCU I, WIESNER J, et al: *Addition of low-dose fluvoxamine to low-dose clozapine monotherapy in schizophrenia: drug monitoring and tolerability data from a prospective clinical trial*. Pharmacopsychiatry, 1999; 32(4): 148-53.
- SZEKERES G. et al.: *Role of Dopamine D3 receptor (DRD3) and DopamineTransporter (DAT) polymorphisms in cognitive dysfunction and therapeutic response to atypical antipsychotics in patients with schizophrenia*. American Journal of Medical Genetics. 2004; 124B: 1-5.
- SZYMANSKI S, JODY D, LEIPZIG R, et al: *Anticholinergic delirium caused by re-treatment with clozapine*. Am J Psychiatry, 1991; 148: 1752.
- TANNER MA, CULLING W: *Clozapine associated dilated cardiomyopathy*. Postgrad Med J 2003;79:412-413

- TANTCHEVA-POOR I, ZAIGLER M, RIETBROCK S, FUHR U: *Estimation of cytochrome P-450 CYP1A2 activity in 863 healthy Caucasians using a saliva-based caffeine test*. Pharmacogenetics, 1999; 9: 131–144.
- TAYLOR D, ELLISON Z, EMENTON SHAW L, et al: *Co-administration of citalopram and clozapine : effect on plasma clozapine levels*. Int Clin Psychopharmacol, 1998; 13: 19-21.
- TECHNOLOGY EVALUATION CENTER: *Special Report Genotyping for Cytochrome P450 Polymorphism to determinate drug-metabolizer status*. Tec Program., 2004 Dec.
- TEFF KL, KIM SF: *Atypical antipsychotics and the neural regulation of food intake and peripheral metabolism*. Physiol Behav. 2011 Sep 26;104(4):590-8. Epub 2011 Jun 12.
- THORUP M, FOG R: *Clozapine treatment of schizophrenic patients: plasma concentrations and coagulation factors*. Acta Psychiatr Scand, 1997; 66: 123-126.
- TIIHONEN J, NOUSIAINEN U, HAKOLA P, et al: *EEG abnormalities associated with clozapine treatment (letter)*. Am J Psychiatry, 1991; 148: 1486.
- TIIHONEN J, VARTIAINEN H, HAKOLA P: *Carbamazepine-induced changes in plasma levels of neuroleptics*. Pharmacopsychiatry, 1995; 28: 26-8.
- TIIHONEN J, LÖNNQVIST J, WAHLBECK K, et al.: *11-year follow-up of mortality in patients with schizophrenia: a population-based cohort study (FIN11 study)*. Lancet. 2009 Aug 22; 374(9690): 620-7.
- THORUP M, FOG R: *Clozapine treatment of schizophrenic patients: plasma concentration and coagulation factors*. Acta Psychiatr Scand, 1977; 66: 123-126.
- TODESCO L, TÖRÖK M, KRÄHENBÜHL S, WENK M: *Determination of -3858G-->A and -164C-->A genetic polymorphisms of CYP1A2 in blood and saliva by rapid allelic discrimination: large difference in the prevalence of the -3858G-->A mutation between Caucasians and Asians*. Eur J Clin Pharmacol, 2003; 59(4): 343-6.
- TOPIWALA A, SEENA S: *The pharmacological management of violence in schizophrenia: a structured review*. Expert Rev Neurother. 2011 Jan; 11(1): 53-63.
- TRIPP AC: *Non fatal embolus associated with clozapine treatment: a case series*. Gen Hosp Psychiatry. 2011 Jan-Feb;33(1):85.e5-6. Epub 2011 Jan 3.
- ULRICH S, BAUMAN B, et al: *Therapeutic drug monitoring of clozapine and relapse – A retrospective study of routine clinical data*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2003; 41(1): 3-13.
- VANDERZWAAG C, MC GEE M, MC EVOY JP, et al.: *Response of patients with treatment-refractory schizophrenia to clozapine within three serum level ranges*. Am J Psych, 1996; 153: 1579-1584.

- VAINER JL, CHOUINARD G: *Interaction between caffeine and clozapine*. J Clin Psychopharmacol, 1994; 14: 284-285.
- VALEVSKI A, KLEIN T, GAZIT E, MEGED S, STEIN D, ELIZUR A, NARINSKY ER, KUTZUK D, WEIZMAN A: *HLA-B38 and clozapine-induced agranulocytosis in Israeli Jewish schizophrenic patients*. Eur J Immunogenet, 1998; 25(1): 11-3.
- VAMPINI C, BELLANTUONO C: *Psicofarmaci e anziani*. Il Pensiero Scientifico Ed., 2002.
- VANDERZWAAG C, MCGEE M, MCEVOY JP, et al: *Response of patients with treatment-refractory schizophrenia to clozapine within three serum level ranges*. Am J Psych, 1996; 153: 1579-1584.
- VAN DAM D, BOSCH TM, MOOKHOEK EJ, HOVENS JE: *Treatment of clozapine-induced tachycardia with propranolol complicated by psoriasis*. Tijdschr Psychiatr. 2012;54(3):285-9.
- VAN STRATER AC, BOGERS JP.: *Interaction of St John's wort (Hypericum perforatum) with clozapine*. Int Clin Psychopharmacol. 2012 Mar;27(2):121-4.
- VAUQUELIN G, BOSTOEN S, VANDERHEYDEN P, SEEMAN P: *Clozapine, atypical antipsychotics, and the benefits of fast-off D(2) dopamine receptor antagonism*. Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol. 2012 Feb 14.
- VESELL ES: *Pharmacogenetic perspectives gained from twin and family studies*. Pharmacol. Ther., 1989; 41, 535-52.
- VOGEL F: *Moderne Probleme der Humangenetik*. Ergebn. Inn. Med. Kinderheilk, 1959; 12: 52-125.
- VOHRA AK: *Treatment of severe borderline personality disorder with Clozapine*. Indian J Psychiatry. 2010 Jul;52(3):267-9.
- VON RICHTER O, et al.: *Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: a comparative analysis in paired tissue specimens*. Clin. Pharmacol. Ther., 2004, 75: 172-83.
- WAGSTAFF AJ, BRYSON HM: *Clozapina: review delle caratteristiche farmacologiche e dell'impiego in pazienti schizofrenici resistenti od intolleranti ai neurolettici classici*. CNS Drugs, 1995; 4: 370-400.
- WAGSTAFF AJ, PERRY G: *Clozapine. In prevention of suicide in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder*. CNS Drugs, 2003; 17(4): 273-80.
- WAHLBECK K, CHEINE M, ESSALI A, ADAMS C: *Evidence of clozapine effectiveness in schizophrenia: a systematic review and meta-analysis of randomized trials*. Am J Psych, 1999; 156: 990-999.

WALKER H, MACAULAY K: *Assessment of the side effects of antipsychotic medication*. Nursing Standard, 2005; 19, 40, 41-46.

WANG B, ZHOU SF. *Synthetic and natural compounds that interact with human cytochrome P450 1A2 and implications in drug development*. Curr Med Chem. 2009; 16(31): 4066-218.

WASSERMAN D, RIHMER Z, RUJESCU D, et al.: *The European Psychiatric Association (EPA) guidance on suicide treatment and prevention*. Neuropsychopharmacol Hung. 2012 Jun;14(2):113-36.

WELFARE MR, AITKIN M, BASSENDINE MF, DALY AK: *Detailed modelling of caffeine metabolism and examination of the CYP1A2 gene: lack of a polymorphism in CYP1A2 in Caucasians*. Pharmacogenetics, 1994; 9: 367-375.

WETZEL H, ANGHELESCU I, SZEGEDI A, et al: *Pharmacokinetic interactions of clozapine with selective serotonin reuptake inhibitors: differential effects of fluoxetine and paroxetine in a prospective study*. J Clin Psychopharmacol, 1998; 18: 2-9.

WILFFERT B, et al: *Pharmacogenetics as a tool in the therapy of schizophrenia*. Pharm World Science, 2005; 27(1): 20-30.

WILLIAM G, PROCYSHYN RM, CHEN E, et al: *A translational research approach to poor treatment response in patients with schizophrenia: clozapine-antipsychotic polypharmacy*. J Psychiatry Neurosci 2009;34(6):433-42.

WINDFUHR K, TURNBULL P, WHILE D, SWINSON N, MEHTA H, HADFIELD K, et al.: *The incidence and associated risk factors for sudden unexplained death in psychiatric in-patients in England and Wales*. J Psychopharmacol. 2010 Oct 15. [Epub ahead of print]

WOOD LD, NEUMILLER JJ, SETTER SM, DOBBINS EK: *Clinical review of treatment options for select nonmotor symptoms of Parkinson's disease*. Am J Geriatr Pharmacother. 2010 Aug; 8(4): 294-315.

WOODAL A, MENKES D, TREVELYAN T, LANCELEY C: *A study of clozapine and long-term hospitalisation rates*. Psychiatric Bulletin 2004, 28:285-288.

XU M, XING Q, LI S, ZHENG Y, WU S, GAO R, et al.: *Pharmacogenetic effects of dopamine transporter gene polymorphisms on response to chlorpromazine and clozapine and on extrapyramidal syndrome in schizophrenia*. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 2010 Aug 16; 34(6): 1026-32. Epub 2010 May 24.

YADAV PN, ABBAS AI, FARRELL MS, et al.: *The Presynaptic Component of the Serotonergic System is Required for Clozapine's Efficacy*. Neuropsychopharmacology. 2010 Nov 3. [Epub ahead of print]

YAMIN S, VADDADI K. *Are we using excessive neuroleptics? An argument for systematic neuroleptic dose reduction in stable patients with schizophrenia with specific reference to clozapine.* Int Rev Psychiatry. 2010; 22(2): 138-47.

YANG L, WANG K, CHEN J et al.: *Exploring Off-Targets and Off-Systems for adverse Drug Reactions via Chemical-Protein Interactome Clozapine-Induced Agranulocytosis as a Case Study.* PLoS Comput Biol 2011 7(3): e1002016. doi:10.1371/journal.pcbi.1002016.

YUNIS JJ, CORZO D, SALAZAR M, LIEBERMAN JA, HOWARD A, YUNIS EJ: *HLA association in clozapine induced agranulocytosis.* Blood, 1995; 86(3): 1177-83.

ZAHODNE LB, FERNANDEZ HH: *Parkinson's psychosis.* Curr Treat Options Neurol. 2010 May; 12(3): 200-11.

ZEVIN S, BENOWITZ NL: *Drug interactions with tobacco smoking: an update.* Clin Pharmacokinet, 1999; 36: 425-438.

ZHORNITSKY S, RIZKALLAH E, PAMPOULOVA T, CHIASSON JP, STIP E, ROMPRÉ PP, POTVIN S: *Antipsychotic agents for the treatment of substance use disorders in patients with and without comorbid psychosis.* J Clin Psychopharmacol. 2010 Aug; 30(4): 417-24.

ZHOU SF, WANG B, YANG LP, LIU JP. *Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2.* Drug Metab Rev. 2010 May; 42(2): 268-354.

ZINK M: *Augmentation of olanzapine in treatment-resistant schizophrenia.* J Psychiatry Neurosci 2005;30(6):409-15.

ZORN SH, JONES SB, WARD KM, LISTON DR: *Clozapine is a potent and selective muscarinic M4 receptor agonist.* Eur J Pharmacol, 1994; 269(3): R1-2.

ZULLINO DF, DELESSERT D, EAP CB, PREISIG M, BAUMANN P: *Tabacco and cannabis smoking cessation can lead to intoxication with clozapine or olanzapine.* Int Clin Psychopharmacol, 2002; 17: 141-143.